

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI ED AGRO –
AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOSICUREZZA E QUALITA'
DEGLI ALIMENTI

TESI DI LAUREA

**CARATTERIZZAZIONE NUTRIZIONALE DI TRE BIRRE
ARTIGIANALI OTTENUTE TRAMITE DIFFERENTI PROCESSI
TECNOLOGICI**

Candidato

Angelo Benvenuto

Relatore

Prof.ssa Annamaria Ranieri

Correlatore

Dott. Andrea Serra

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

Alla mia famiglia...

Indice

PREMESSA	6
1. INTRODUZIONE	8
1.1 LA BIRRA NEL CORSO DEI SECOLI	10
1.1.1 MONDO ANTICO.....	10
1.1.2 MEDIOEVO	12
1.1.3 DALL'ETA' MODERNA AI GIORNI NOSTRI	13
1.1.4 LA RISCOPERTA DELLA BIRRA ARTIGIANALE	15
1.2 MATERIE PRIME	19
1.2.1 CEREALI	19
1.2.2 ACQUA.....	23
1.2.3 LUPPOLO	27
1.2.4 LIEVITO	32
1.3 PROCESSO PRODUTTIVO	36
1.3.1 MALTATURA	37
1.3.2 AMMOSTAMENTO.....	41
1.3.3 RISCIAQUO DELLE TREBBIE	45
1.3.4 BOLLITURA DEL MOSTO	46
1.3.5 FERMENTAZIONE	49
1.4 RUOLO ED IMPORTANZA DEGLI ANTIOSSIDANTI	51
1.4.1 GLI ANTIOSSIDANTI DEL MALTO	53
1.4.2 GLI ANTIOSSIDANTI DEL LUPPOLO	57

1.5 CELIACHIA.....	63
1.5.1 NORMATIVA VIGENTE SUL GLUTINE.....	63
1.5.2 BIRRA E GLUTINE	64
2. OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI	68
3. MATERIALI E METODI	69
3.1 PRODUZIONE BRASSICOLA	69
3.1.1 L'IMPIANTO GEOTERMICO	69
3.1.2 CARATTERISTICHE BIRRE PRODOTTE	70
3.2 PRETRATTAMENTO CAMPIONI.....	72
3.2.1 ANALISI DELLO SPETTRO DI ASSORBIMENTO	72
3.2.2 LIOFILIZZAZIONE	73
3.3 DOSAGGIO DELLA COMPONENTE FENOLICA TOTALE.....	75
3.4 DOSAGGIO DEI FLAVONOIDI TOTALI	77
3.5 DOSAGGIO DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE	79
3.6 ANALISI DEL PROFILO FENOLICO IN HPLC	82
3.7 ABBATTIMENTO E DOSAGGIO DEL GLUTINE TOTALE.....	85
3.7.1 MALTO DINGEMANS PALE ALE	85
3.7.2 SPINDASOL SB1	86
3.7.3 RIDASCREEN GLIADIN COMPETITIVE ELISA KIT	87
4. RISULTATI	91

4.1 DOSAGGIO DELLA COMPONENTE FENOLICA TOTALE.....	91
4.2 DOSAGGIO DEI FLAVONOIDI TOTALI	93
4.3 DOSAGGIO DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE	94
4.4 ANALISI DEL PROFILO FENOLICO IN HPLC	96
4.5 ABBATTIMENTO E DOSAGGIO DEL GLUTINE TOTALE.....	99
5. DISCUSSIONE	101
6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	106
7. BIBLIOGRAFIA	108
8. SITOGRAFIA	118
RINGRAZIAMENTI	119

PREMESSA

Questo lavoro di tesi sperimentale va inquadrato all'interno del progetto “La Staffetta a Vapore” che prende il via, a partire da Novembre 2014, grazie alla collaborazione nata tra due realtà attive nella provincia di Pisa: il birrificio “Vapori di Birra” situato nella frazione di Sasso Pisano (comune di Castelnuovo di Val di Cecina) e l'associazione “La Staffetta”, con sede nel comune di Vecchiano (Fig. 1).



Figura 1 – Partner del progetto “La Staffetta a Vapore”.

Vapori di Birra è il primo birrificio artigianale italiano ad impiegare il vapore geotermico come fonte primaria di energia per il processo brassicolo, nel pieno rispetto dell'ambiente; il birrificio fa parte, inoltre, dell'associazione “Agricoltori Custodi del Cibo a Energie Rinnovabili della Toscana”, prima comunità mondiale del cibo ad energia pulita e rinnovabile, operante nel settore agro – alimentare costituita da imprenditori che hanno come priorità la sostenibilità ambientale, in collaborazione con Slow Food Toscana, Fondazione Slow Food per la Biodiversità e CoSviG.

La Staffetta, affiliata alla rete dei circoli ARCI, è un'associazione la cui principale missione è la sperimentazione, promozione e condivisione, all'interno del tessuto sociale locale, di nuovi stili di vita, di lavoro, di

economia e di relazioni sociali sostenibili che possano rappresentare una valida alternativa alla crisi sempre più dilagante della società moderna.

Il fulcro operativo della Staffetta è rappresentato dalla filiera della birra artigianale intorno al quale si sviluppa tutta la rete di attività portate avanti dall'associazione; tra queste troviamo: forme di agricoltura di autosostentamento e dimostrativa, corsi di formazione sulla produzione brassicola casalinga, sulla gestione di un microbirrificio e sulla progettazione di bandi locali ed europei, attività culturali, musicali e sportive; ancora, la Staffetta, grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro – Ambientali dell'Università di Pisa, mette in atto progetti di ricerca scientifica nell'ambito della filiera brassicola: il seguente lavoro di tesi ne rappresenta un esempio.

1. INTRODUZIONE

Secondo la legge n. 1354 del 16/08/1962 e sue successive modifiche (leggi 329/74 e 141/89, D.L. 109/92, D.P.R. 272/98) la denominazione birra è riservata a quel prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica con ceppi selezionati di *Saccharomyces cerevisiae* e di *Saccharomyces carlsbergensis* (conosciuto oggi anche come *Saccharomyces pastorianus*) di un mosto preparato con malto d'orzo o di frumento o di loro miscele ed acqua, amaricato con luppolo o suoi derivati o entrambi; inoltre, alla fermentazione alcolica è possibile abbinare la fermentazione lattica.

In Italia, per la classificazione della birra si utilizzano due differenti parametri quali il titolo alcolometrico volumico, indicante la percentuale di etanolo presente nel prodotto finito ed il grado saccarometrico (o grado Plato), definito come la quantità in grammi di estratto secco contenuto in 100 g di mosto. Sulla base di questi parametri è possibile suddividere il prodotto birra in cinque categorie:

- **Birra “Analcolica”**: avente grado Plato compreso tra 3 ed 8 e titolo alcolometrico volumico inferiore a 1,2% vol;
- **Birra “Leggera” o “Light”**: avente grado Plato compreso tra 5 e 10,5 e titolo alcolometrico volumico tra 1,2% vol e 3,5% vol;
- **Birra “Classica”**: avente grado Plato non inferiore a 10,5 e titolo alcolometrico volumico superiore a 3,5% vol;
- **Birra “Speciale”**: avente grado Plato non inferiore a 12,5 e titolo alcolometrico volumico superiore a 3,5% vol;
- **Birra “Doppio Malto”**: avente grado Plato non inferiore a 14,5 e titolo alcolometrico volumico superiore a 3,5% vol.

Le terminologie sopra elencate non ci danno tuttavia nessun tipo di informazione riguardanti la tipologia e le caratteristiche del prodotto birra in quanto vengono utilizzate soltanto per stabilire l'importo dell'accisa che i produttori devono versare all'erario. Quello che possiamo dire è che, in linea

generale, le birre analcoliche, light e classiche sono prodotte maggiormente a livello industriale mentre le speciali e le doppio malto le ritroviamo maggiormente nelle realtà artigianali.

1.1 LA BIRRA NEL CORSO DEI SECOLI

1.1.1 MONDO ANTICO

Non vi è una data precisa relativa alla nascita della birra, tuttavia le prime testimonianze la fanno risalire al IV millennio A.C. presso le civiltà mesopotamiche ed in particolar modo quella sumerica quando, presumibilmente, l'uomo abbandonando lo stile di vita nomade cominciò a coltivare cereali come l'orzo ed il frumento (Nelson, 2005); a questo aspetto possiamo poi affiancare il fatto che la scoperta di questo prodotto fu anche dovuta, probabilmente, ad episodi accidentali quali lo sviluppo di processi fermentativi spontanei a carico di sementi venute involontariamente a contatto con l'acqua.

Di certo quella di allora non era la birra dei giorni nostri bensì una bevanda grezza (costituita da orzo, farro o miscele di cereali) molto diversa rispetto a quella che oggi noi conosciamo anche perché piuttosto che una piacevole bevanda veniva considerata un vero e proprio alimento e quindi assunta a scopo nutritivo.

Ai Sumeri succedettero gli Assiri – Babilonesi ed in particolar modo all'interno del Codice di Hammurabi (promulgato dal sovrano babilonese omonimo vissuto tra il XIX ed il XVIII secolo A.C.) troviamo, tra le altre, una legge (la più antica in tema di birra) che va a disciplinare la produzione ed il commercio della bevanda (Turri, 2008) con pene, per i trasgressori, che potevano arrivare fino alla condanna a morte. Dati gli stretti rapporti commerciali che intercorrevano tra le civiltà mesopotamiche e le popolazioni confinanti, la birra giunse successivamente anche in Egitto il quale divenne in tempi molto rapidi una delle zone di maggior produzione e consumo; la birra qui assunse un significato antropologico molto importante, basti pensare al fatto che veniva offerta alle diverse divinità nel corso delle cerimonie funebri al fine di favorire il viaggio nell'aldilà del defunto.

Con il successivo fiorire della civiltà greca prima e romana poi la birra raggiunse l'Europa mediterranea; c'è da dire però che i greci, in generale, non ne erano grandi amanti ed anzi, nonostante si fosse diffusa nelle loro terre, la consideravano una bevanda volgare e proprio per questo motivo pare che la chiamassero “vino d'orzo” in senso dispregiativo (curioso il fatto che oggi lo stesso termine “Barley Wine” indichi uno stile ben preciso).

Un'eccezione è però rappresentata dagli abitanti di Creta i quali producevano una birra chiamata “*bruton*” che consumavano in quantità quasi pari al vino (Del Vecchio, 2014).

Stesso discorso può essere sostanzialmente fatto per la civiltà romana nella quale si consumava birra, chiamata “*cerevisia*” in onore della dea delle messi, soprattutto nelle zone di campagna dal momento che nelle città era il vino la bevanda più consumata.

Parallelamente all'arrivo della birra nell'Europa mediterranea si assistette, come conseguenza delle grandi migrazioni dei popoli asiatici, alla diffusione della bevanda nel nord dell'Europa grazie soprattutto alle popolazioni celtiche.

E' proprio in questa fase storica, quindi, che si plasmarono due aree culturali europee ben definite: la prima rappresentata dalla vite e dal vino (nell'Europa mediterranea); la seconda costituita dall'orzo, dal luppolo e appunto dalla birra (nel nord Europa) con un progressivo spostamento del baricentro geografico di produzione verso settentrione il quale portò in poco tempo alla completa emarginazione della regione egiziana – medio orientale; questo perché, ad esempio, i cereali utilizzati come materie prime, a differenza della vite, non richiedono alte temperature per prosperare mentre prediligono lunghe esposizioni giornaliere alla luce solare (soprattutto l'orzo) ed è noto come, nel nostro emisfero, la durata delle ore di luce aumenta man mano che ci si sposta dall'equatore verso il polo.

1.1.2 MEDIOEVO

E' proprio nel periodo medioevale che si verificò da un lato, una forte fase di espansione e dall'altro, un'evoluzione tecnologica del processo brassicolo (ad esempio è in questo periodo che viene introdotto il luppolo come aromatizzante e stabilizzante antibatterico) con quest'ultimo che, col passare del tempo, si trasformò progressivamente da processo puramente casalingo a processo semi industriale (Del Vecchio, 2014). Il punto centrale intorno al quale ruotava la produzione della birra medioevale era rappresentato dal monastero: basti pensare al fatto che intorno all'anno mille in Baviera si concentravano circa 500 birrerie abbaziali una delle quali, quella di Norimberga, arrivava a produrre circa 3000 hl l'anno.

Oltre che su vasta scala nei monasteri la birra veniva prodotta e consumata in grandi quantità anche per uso domestico soprattutto a livello delle classi sociali più deboli le quali non potevano disporre facilmente di acqua potabile; la birra infatti veniva prodotta con acqua sottoposta ad una fase di bollitura con la quale si andavano ad eliminare tutti i microrganismi patogeni eventualmente presenti. Per questi ceti sociali, quindi, la birra rappresentava l'alimento maggiormente sicuro soprattutto se paragonato all'acqua o al latte.

Come già detto in precedenza, è durante il Medioevo che assistiamo ad una svolta epocale in ambito brassicolo dal momento che è proprio in questa fase storica che avviene l'introduzione del luppolo nel processo tecnologico; quest'ultimo venne introdotto in un primo momento come ingrediente aromatizzante in grado di conferire al prodotto un sapore gradevole (Bottero *et al.*, 2009) ed in seguito, grazie agli studi condotti dalla botanica Suor Hildegard von Bingen (1098 – 1179), suora dell'abbazia St'Rupert in Germania, si riuscì a dimostrare che grazie al luppolo la birra si conservava più a lungo e meglio (Turri, 2008).

1.1.3 DALL'ETA' MODERNA AI GIORNI NOSTRI

Con l'avvento dell'Età Moderna la birra acquisì una diffusione tale da rendere necessari degli interventi a livello legislativo che andassero a disciplinarne tanto la produzione quanto la commercializzazione tenendo conto, inoltre, del fatto che si cominciava a sentire il bisogno di preservare anche l'aspetto qualitativo del prodotto.

La prima legge che andava in questa direzione fu rappresentata, senza ombra di dubbio, dal “*Reinheitsgebot*” meglio conosciuto come “Editto di Purezza” emanato da Guglielmo IV di Baviera nel 1516 dove si stabilivano delle regole ben precise per la produzione brassicola: specificatamente, i produttori di birra erano autorizzati ad utilizzare soltanto tre ingredienti per la produzione brassicola: acqua, orzo e luppolo (non si parla di lievito in quanto ancora non conosciuto).

C'è da dire che la normativa in questione incontrò il dissenso di molti birrai tedeschi poiché vietava loro la produzione di birre contenenti ingredienti speciali come ad esempio le birre speziate che allora venivano prodotte nella Germania settentrionale.

E' fondamentale sottolineare il fatto che la genesi del *Reinheitsgebot* è da ricercarsi, piuttosto che nella volontà di difendere il prodotto birra, nella necessità di preservare cereali come il frumento i cui raccolti scarseggiavano e per questo motivo, tramite l'Editto, si decise di destinarlo unicamente alla produzione del pane sottraendolo così alla filiera brassicola. Ancora oggi, comunque, nonostante la comunità europea l'abbia fatto decadere nel 1987 in nome della libera concorrenza, molti birrifici tedeschi aderiscono spontaneamente al principio dell'Editto; questo perché sanno che ciò porterà ai loro prodotti dei significativi vantaggi in termini di marketing pubblicitario (Bottero *et al.*, 2009).

Sempre in Germania fu introdotta, in epoca rinascimentale, un'innovazione destinata a rivoluzionare il sistema di fermentazione della birra. Fino ad

allora infatti la produzione sfruttava il metodo dell'alta fermentazione ovvero quella innescata da lieviti attivi a temperature tra i 15 – 25°C e, ricordiamolo, ancora sconosciuti. Nei mesi estivi si verificavano però delle anomalie con contaminazioni batteriche che andavano ad alterare e rovinare il prodotto finito; per questa ragione in alcuni monasteri bavaresi si cominciò a stoccare la birra al fresco delle cantine dove ci si accorse che si conservava meglio e durava più a lungo grazie all'azione di un'altra categoria di lieviti, attivi a temperature tra i 5 – 10°C. A queste birre venne assegnato il nome di “*Lager*” le quali divennero a partire dal XIX secolo le regine incontrastate del mercato. Fu infatti allora che si verificarono due eventi decisivi: in primo luogo, nel 1883, venne individuato ed isolato il ceppo attivo a basse temperature grazie al lavoro svolto dal ricercatore danese Emil Hansen il quale chiamò il lievito *Saccharomyces carlsbergensis* in onore del fondatore dell'industria Carlsberg nei cui laboratori Hansen aveva svolto la propria attività; in secondo luogo, nel contesto della rivoluzione industriale, si assiste alla rapida comparsa ed evoluzione di tecniche e strumenti progettati per la refrigerazione artificiale permettendo così alle Lager di essere prodotte al di fuori dei climi rigidi. Lo sviluppo industriale contribuì anche a mettere a disposizione, tramite le ferrovie, un sistema veloce per il trasporto di grossi quantitativi di prodotto fino a destinazioni anche molto lontane. Tutto ciò contribuì a creare un'industria brassicola su larga scala il cui scopo era quello di incrementare la produzione contenendone, tuttavia, i costi (Bottero *et al.*, 2009). Superate le difficoltà legate all'emanazione di leggi restrittive in paesi fortemente consumatori come ad esempio gli Stati Uniti (sono noti a tutti gli anni del “proibizionismo” tra il 1920 ed il 1933 durante i quali si arrivò a vietare la preparazione e la somministrazione di alcolici) ed una volta conclusosi il secondo conflitto mondiale si assistette alla nascita di nuove birrerie. Quest'ultime, ad eccezione di quelle belghe e tedesche che continuavano a mantenere le loro antiche tradizioni, erano essenzialmente

delle grandi fabbriche grazie alle quali nacquero i primi grandi marchi internazionali da destinare al mercato mondiale. Dopo questa esplosione delle grandi fabbriche di birra si ricominciò, a partire dagli anni settanta, a riapprezzare la birra di qualità, più personale e meno commerciale; il primo passo in questa direzione fu la creazione dell'associazione Camra (Campagna per le “Ale” autentiche), ideata da un consorzio di consumatori inglesi con l'intento di riportare in auge il prodotto artigianale.

1.1.4 LA RISCOPERTA DELLA BIRRA ARTIGIANALE

Definire la birra artigianale è un'operazione piuttosto complessa; la legislazione italiana non ne contempla il concetto fissando soltanto, per esigenze di prelievo fiscale, un tetto produttivo nell'ordine di 10000 hl / anno.

Si possono comunque elencare tutta una serie di caratteristiche che la contraddistinguono:

- Prodotta con l'utilizzo di malto d'orzo;
- Assenza di pastorizzazione e filtrazione;
- Gasatura naturale dovuta, quindi, alla sola attività del lievito (nessun utilizzo di anidride carbonica esogena);
- Lieve carbonatazione in bottiglia;
- Assenza di coloranti, conservanti ed additivi chimici.

Nonostante non vi sia una denominazione chiara da un punto di vista normativo, le caratteristiche sopra elencate ci permettono di discriminare in modo abbastanza intuitivo un prodotto artigianale da uno industriale.

Il fenomeno della birra artigianale esplose completamente intorno agli anni '80 negli Stati Uniti come un movimento culturale che si proponeva di sottrarsi a schemi legati all'industria ed alla grande distribuzione per rivalutare l'individuo. In questi anni molti ragazzi americani grazie alla loro

passione cominciarono a produrre birra in casa con progressivo spostamento prima e diffusione poi del fenomeno in Europa.

La birra artigianale, oggi, viene prodotta da medie e piccole unità produttive le quali tendono ad operare in ambito locale: da un lato abbiamo la produzione in ambito domestico (homebrewing), dall'altro assistiamo ad una sempre maggior diffusione a livello imprenditoriale dei cosiddetti "microbirrifici"; quest'ultimi sono da considerarsi delle vere e proprie aziende birraie in grado di produrre quantità significative di birre artigianali che poi vengono vendute a terzi.

A livello organizzativo, in Italia si sono affermate quattro differenti tipologie di microbirrifici:

- **Birrifici artigianali classici:** caratterizzati da produzione del prodotto senza mescolta; sono quelli contraddistinti da meccaniche lavorative maggiormente paragonabili ai classici birrifici industriali;
- **Brew Pub:** caratterizzati dalla presenza di un locale dedicato alla produzione abbinato ad un servizio pub e/o di ristorazione;
- **Beer Firm:** rappresentati da produttori che non dispongono di un proprio impianto di produzione e per questo motivo utilizzano impianti di altri birrifici per la realizzazione delle proprie ricette;
- **Birrifici Agricoli:** tipologia di microbirrificio che si distingue da quelli sopra elencati per l'obbligo che l'azienda ha di dover autoprodurre la maggior parte delle materie prime da utilizzare poi nel processo produttivo, ad esempio maltando i cereali di produzione propria presso una struttura consortile alla quale l'azienda stessa aderisce. I birrifici agricoli sono presenti, in Italia, maggiormente in determinate regioni quali Marche (16,7 %), Piemonte (12,5 %), Emilia – Romagna (9,7 %), Toscana (9,7%), Veneto (8,3 %) e Lombardia (8,3%) (Fastigi *et al.*, 2015).

Il settore della birra artigianale è costantemente in ascesa ed è stato in grado negli ultimi anni di rosicchiare progressivamente quote di mercato sempre maggiori. In conclusione vengono riportate di seguito due tabelle (Tab. 1; Tab. 2) nelle quali vengono descritte dettagliatamente il grado di evoluzione e di eterogeneità del settore brassicolo artigianale italiano.

Anno	Numero di microbirrifici	Variazione annuale (%)	Tasso di entrata*	Tasso di uscita*
1996	16	–	100,0	22,2
1997	22	38	37,5	0,0
1998	30	36	45,5	9,1
1999	44	47	53,3	6,7
2000	58	32	31,8	0,0
2001	70	21	20,7	0,0
2002	82	17	20,0	2,9
2003	95	16	22,0	6,1
2004	105	11	17,9	7,4
2005	124	18	21,9	3,8
2006	152	23	23,4	1,6
2007	185	22	23,7	2,0
2008	233	26	29,2	3,2
2009	269	15	18,9	4,3
2010	326	21	23,8	2,2
2011	379	16	26,4	9,2
2012	472	25	29,6	5,3
2013	604	28	33,1	4,9
2014	754	25	25,8	1,2

Tabella 1 – Microbirrifici italiani attivi, variazione annuale, tassi di entrata ed uscita (1996 – 2014); *Tasso di entrata (uscita): [n. entrate (uscite) dell'anno / n. microbirrifici attivi nell'anno precedente] x 100; Fonte: Elaborazione su dati <http://microbirrifici.org>

Regione	Tipologia di microbirrificio				Totale	Birrifici per 100.000 abitanti
	Birrifici artigianali	<i>Brew Pub</i>	<i>Beer Firm</i>	Birrifici agricoli		
Abruzzo	13	0	7	3	23	1,73
Basilicata	3	0	1	0	4	0,70
Calabria	8	1	2	0	11	0,56
Campania	24	6	8	2	40	0,68
Emilia Romagna	21	10	16	7	54	1,21
Friuli Venezia Giulia	7	9	2	4	22	1,80
Lazio	20	7	24	3	54	0,92
Liguria	10	8	2	1	21	1,33
Lombardia	58	21	41	6	126	1,26
Marche	11	2	15	12	40	2,59
Molise	3	0	2	1	6	1,92
Piemonte	39	17	17	9	82	1,86
Puglia	16	9	9	1	35	0,86
Sardegna	17	3	3	1	24	1,45
Sicilia	15	7	6	2	30	0,59
Toscana	43	9	11	7	70	1,87
Trentino Alto Adige	5	13	3	4	25	2,37
Umbria	13	1	2	3	19	2,13
Valle d'Aosta	1	2	1	0	4	3,13
Veneto	27	15	16	6	64	1,30
Totale	354	140	188	72	754	1,24

Tabella 2 – Microbirrifici in Italia per regione, tipologia e densità (2014).

Fonte: Elaborazione su dati <http://microbirrifici.org>

1.2 MATERIE PRIME

Le materie prime utilizzate per la produzione brassicola sono principalmente quattro:

- Cereali
- Acqua
- Luppolo
- Lievito

1.2.1 CEREALI

I cereali sono piante erbacee, appartenenti alla famiglia delle *Graminacee*, che, come tutte le piante, partendo dall'acqua e dall'anidride carbonica presente nell'atmosfera, sono in grado di sintetizzare amido il quale viene stoccato all'interno delle cariossidi.

Il cereale più utilizzato per la produzione della birra è, ed è sempre stato, l'orzo in quanto molto ricco di amido, di enzimi e poiché dotato di glumella (scorza) che lo protegge durante la lavorazione; nonostante ne esistano numerose varietà, in ambito brassicolo ne vengono utilizzate soltanto tre: orzo distico, orzo tetrastico ed orzo esastico (quest'ultimi due conosciuti anche come orzi polistici). Partendo dal presupposto che ogni spiga d'orzo è costituita da una serie di nodi o rachidi ciascuna delle quali sostiene sei fiori potenziali, la distinzione tra orzo distico, tetrastico ed esastico avviene a seconda che due, quattro o sei fiori vengano resi fertili sviluppando così un numero pari di chicchi sulle rachidi (Fig. 2). Per la produzione brassicola non è certo il numero delle cariossidi ad influenzare la scelta della tipologia da impiegare bensì fattori come ad esempio il loro contenuto proteico; più proteine significa più enzimi, miglior schiuma, miglior corpo, migliore capacità di attacco dell'amido, aumentata efficienza del lievito. Parallelamente a questi aspetti positivi c'è da dire, però, che un eccessivo contenuto proteico può portare a problematiche quali eccessiva torbidità,

fenomeni di imbrunimento indesiderati (reazione di Maillard) ed instabilità del prodotto finito in bottiglia.

La varietà maggiormente utilizzata per brassare, soprattutto in Europa, è rappresentata dall'orzo distico questo perché, oltre che un adeguato contenuto proteico ed una e maggiore produzione di diastasi (α e β – amilasi) durante la germinazione (Sunier, 1988), possedendo dimensioni maggiori con un elevato rapporto tra contenuto amidaceo e glumella garantisce un maggior apporto di amido ed una minor probabilità di estrarre sostanze tanniche indesiderate con minor astringenza e minor intorbidimento a livello di prodotto finito. E' importante sottolineare come la maggior parte dell'orzo usato per la birrificazione non venga impiegato tal quale; questo perché una volta raccolto viene sottoposto ad un processo di trasformazione, noto come maltatura o maltazione grazie al quale lo si trasforma in malto, del quale ci occuperemo più avanti quando parleremo delle fasi del processo brassicolo.

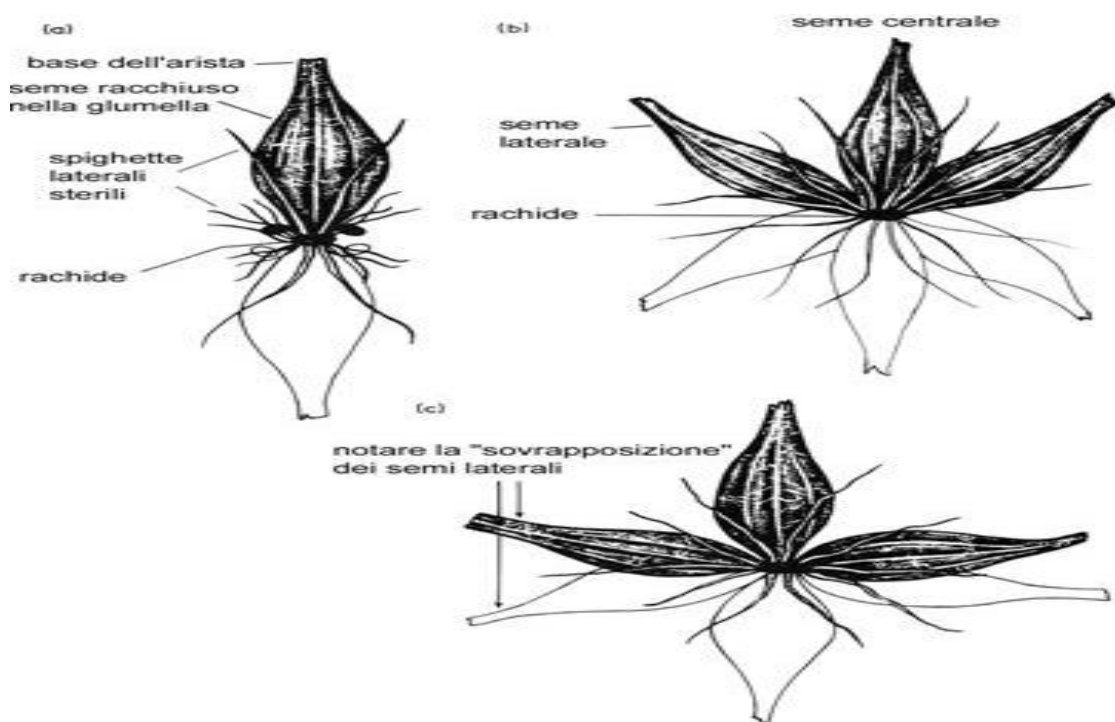


Figura 2 – Caratteristiche morfologiche dell'orzo distico (a), esastico (b) e tetrastico (c)

In molti paesi la normativa consente l'utilizzo di cereali che sostituiscano in parte l'orzo (in Italia fino al 40% dei grani totali utilizzati); queste materie

prime alternative sono note col termine di “sucedanei” (Bottero *et al.*, 2009).

I sucedanei vengono utilizzati sia per ragioni economiche in quanto hanno un costo inferiore rispetto all’orzo (maltato) sia per conferire al prodotto particolari caratteristiche sensoriali e tecnologiche come ad esempio una maggiore tenuta della schiuma ed un miglioramento della stabilità colloidale (Briggs *et al.*, 1981). Il loro impiego garantisce, quindi, indubbi vantaggi anche se bisogna tener conto del fatto che il loro utilizzo determina un impoverimento del quantitativo di enzimi e di azoto libero disponibili con ripercussioni negative sull’attività del lievito in fermentazione; per questo motivo, in presenza di un mosto contenente sucedanei, si procede in fase di ammostamento ad una correzione del pH.

Esempi di sucedanei sono:

- **Frumento:** può essere usato maltato, non maltato o in forma di fiocchi; favorisce, se usato in piccole quantità (1 – 5%), la formazione e la ritenzione della schiuma conferendo inoltre al prodotto finito particolari sentori (dalla vaniglia al coriandolo). Non possedendo la glumella può dar luogo a problemi in fase di filtrazione. E’ necessario evitare che il contenuto proteico si innalzi troppo in sede di maltatura al fine di evitare tutte le problematiche con esso connesse;
- **Avena:** usata per dare morbidezza soprattutto se in contrasto con acqua eccessivamente dura e per conferire oleosità e cremosità in quanto molto ricca in grassi. L’elevato tenore lipidico è il motivo per il quale viene utilizzata generalmente in fiocchi in quanto incompatibile con la fase di maltatura;
- **Segale:** disponibile maltata, a fiocchi o torrefatta. Utilizzata per dare cremosità alla schiuma ed oleosità estrema se usata in grande quantità. Presentando un elevato contenuto in pectine e β – glucani può creare problemi in ammostamento ed in fase di filtraggio se utilizzata in

quantità eccessive (generalmente non deve superare il 20 – 30 % del totale nel grist dei malti);

- **Sorgo:** diffuso soprattutto in Africa. Cereale privo di glutine presenta un elevato tenore in tannini che tendono quindi ad intorbidire di molto il prodotto finito;
- **Mais:** usato molto a livello industriale. Non contenente glutine è una ottima fonte di amido e di oli i quali però devono essere separati per evitare difetti quali deterioramento rapido del gusto a causa dei processi ossidativi e scarsa tenuta della schiuma. Utilizzato anche in fiocchi al fine di chiarificare la birra ed alleggerirne il gusto;
- **Riso:** usato per aumentare la quantità di zuccheri fermentescibili e per accentuare l'amaro. Anch'esso, come il mais, è privo di glutine e molto utilizzato a livello industriale;
- **Miglio:** l'impiego nel processo di birrificazione è essenzialmente legato alla produzione di una birra priva di glutine.

Esiste infine un'ulteriore classe di materie prime nota come “pseudocereali”. Quest'ultimo è un termine non botanico coniato per identificare le piante non appartenenti alla famiglia delle *Graminacee* ma che tuttavia possono essere impiegate nel processo brassicolo. Esempi di pseudocereali sono il grano saraceno, l'amaranto e la quinoa; il loro utilizzo è essenzialmente legato al fatto che, come sorgo, mais, riso e miglio, sono privi delle strutture proteiche che una volta a contatto con l'acqua andranno a formare il glutine e quindi vengono impiegati principalmente per la produzione delle ricette Gluten – Free.

Per riassumere quanto detto nel seguente paragrafo viene di seguito riportata una tabella (Tab. 3) nella quale vengono mostrate le principali caratteristiche chimiche dei cereali maggiormente utilizzati nel processo brassicolo.

Cereali	Proteine	Amido	Lipidi	Fibra	Ceneri
Orzo	9	78.8	2.1	2.1	2.5
Frumento Duro	13	70.0	1.9	2.5	1.5
Frumento Tenero	12	71.7	1.9	2.5	1.4
Avena	16	68.2	7.7	1.6	2.0
Segale	10	73.4	1.8	2.6	2.1
Sorgo	10	73.0	3.6	2.2	1.6
Mais	10	72.2	4.7	2.4	1.5
Riso	8	77.4	2.4	1.8	1.5
Miglio	11	72.9	3.3	8.1	3.4

Tabella 3 – Composizione chimica espressa in valori percentuali dei principali cereali utilizzati in ambito brassicolo. Fonte: Pomeranz Y, 1987.

1.2.2 ACQUA

L'acqua in termini quantitativi rappresenta l'ingrediente predominante nelle ricette birrarie (costituisce circa il 90% del prodotto finito) e svolge un ruolo fondamentale nella caratterizzazione della birra. Per comprenderne l'importanza basta pensare al fatto che nei secoli scorsi i birrifici erano situati molto spesso in prossimità di sorgenti idriche; ciò garantiva un approvvigionamento costante alla struttura che necessitava di ingenti quantità per la produzione. Oggi come allora la tipologia di acqua da utilizzare per la produzione della birra e di un determinato stile dipende essenzialmente dalla natura della stessa, in relazione principalmente a quello che è il parametro più importante nel processo tecnologico ovvero la durezza la quale è in grado di influenzare fortemente le caratteristiche sensoriali del prodotto finito. La durezza totale dell'acqua è definita come la somma degli

ioni dei metalli alcalino – terrosi (Ca^{2+} e Mg^{2+}) e può essere suddivisa in “durezza temporanea” (o carbonatica) e “durezza permanente” (o non carbonatica).

Con durezza temporanea si intende specificare il contenuto di calcio e magnesio sotto forma di bicarbonati i quali in seguito all’ebollizione tendono a precipitare sotto forma del carbonato corrispondente con conseguente perdita di anidride carbonica secondo la seguente reazione:



Si parla invece di durezza permanente in relazione a tutte quelle componenti come solfati, nitrati e cloruri (SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^-) che rimangono disciolte anche a temperature di ebollizione. La durezza dell’acqua influenza notevolmente il processo tecnologico in quanto gli ioni in essa presenti andranno ad agire sul pH del mosto: gli ioni calcio (Ca^{2+}) e magnesio (Mg^{2+}) provocano un decremento del pH mentre lo ione bicarbonato (HCO_3^-) ne va a determinare un aumento. Dal momento che il pH influenza l’attività enzimatica, ecco che il parametro “durezza” assume un significato fondamentale durante la fase di ammostamento. E’ per questo motivo che oramai tutti i birrifici provvedono ad effettuare delle analisi periodiche dell’acqua di processo ed a correggerne la composizione in presenza di eventuali problemi come ad esempio la presenza di acque eccessivamente dure che potrebbero determinare un incremento anomalo del pH con ripercussioni negative a livello di degradazione di amido e proteine unitamente ad una vigorosa estrazione delle glumelle con impatto organolettico negativo nel prodotto finito (Buiatti, 2004).

Il monitoraggio dell’acqua è importante anche per quanto riguarda il tipo di prodotto che si vuole produrre: alcune birre conosciute in tutto il mondo infatti devono le proprie caratteristiche proprio all’acqua impiegata nel processo produttivo. E’ il caso delle “*Pilsner*”, prodotte nella città di Pilzen in Repubblica Ceca utilizzando l’acqua del posto caratterizzata da una

minore durezza mentre un esempio opposto può essere rappresentato dalle birre scure tipiche delle regioni di Dortmund e Monaco (ma anche le “*Bitter Ale*” inglesi) nelle quali viene impiegata un’acqua maggiormente dura in maniera tale da poter così aumentare la sensazione di amaro derivante dal luppolo (Zasio *et al.*, 1997; Buiatti, 2009).

In ogni caso, se da un’analisi della durezza l’acqua dovesse risultare non idonea per il processo tecnologico è possibile sottoporre la stessa ad una serie di trattamenti volti a modificarne la composizione in funzione delle caratteristiche della ricetta che si vuole produrre (ad esempio diminuire la durezza, l’alcalinità e la quantità di sali soprattutto nel caso in cui si voglia produrre una birra chiara oppure ottenere un aumento del contenuto salino per la produzione di birre più scure ed amare).

I trattamenti che possono essere impiegati nell’ambito delle produzioni casalinghe o a livello di microbirrificio sono i seguenti:

- **Decarbonatazione per bollitura a pressione atmosferica:** processo piuttosto semplice volto a diminuire la durezza temporanea e quindi l’alcalinità dell’acqua. Consiste nel portare l’acqua ad ebollizione con la conseguente riduzione del grado di concentrazione di bicarbonati i quali tendono a precipitare sotto forma di carbonati insolubili;
- **Decarbonatazione con acqua di calce:** processo tipico dell’industria ma che è possibile ritrovare anche a livello dei microbirrifici maggiormente strutturati. Il procedimento consiste nell’aggiungere, all’acqua da trattare, dell’acqua limpida satura di calce (Ca(OH)_2) a cui seguirà una fase di decantazione e successiva eliminazione del fango composto da carbonato di calcio ed idrato di magnesio insolubili. Per grandi volumi da trattare questo stratagemma risulta essere più vantaggioso rispetto alla bollitura a condizione che vi siano degli impianti adeguati ed una certa preparazione del personale che esegue l’operazione;

- **Demineralizzazione per scambio ionico:** processo che viene effettuato grazie all'utilizzo dei cosiddetti "addolcitori". Quest'ultimi funzionano secondo il principio dello scambio ionico e consistono in cartucce riempite con resine sintetiche in grado di assorbire determinati sali dall'acqua e di cederne altri sotto forma di ioni. Nei sistemi più semplici lo scambio è solo di tipo cationico, quindi in grado di agire sulla durezza temporanea da carbonati mentre in quelli più complessi agli scambiatori cationici vengono accoppiati quelli anionici i quali consentono di ottenere un'acqua praticamente priva di sali disciolti in essa;
- **Osmosi inversa:** sistema nel quale, grazie all'utilizzo di impianti muniti di membrane semipermeabili, si riesce ad ottenere un'acqua completamente libera dalla presenza di sali disciolti. E' importante sottolineare il fatto che questo sistema si è molto diffuso a livello casalingo e che l'acqua ottenuta in questo modo va necessariamente corretta mediante l'aggiunta di sali o "tagliandola" con acqua non trattata;
- **Aggiunta di sali:** sistema di correzione dell'acqua molto impiegato soprattutto nei casi in cui sia necessario aumentarne il tenore di calcio e di solfati. Per questo scopo esistono in commercio appositi sali ad uso alimentare come il solfato di calcio (detto anche "sale di gypsum") ed il cloruro di calcio. Nell'aggiunta di queste preparazioni, al fine di non sbagliare il dosaggio, bisogna tenere conto di alcuni aspetti quali caratteristiche dell'acqua da correggere, tenore ionico finale ricercato e la tipologia di sale utilizzato in relazione al suo contributo ionico (Briggs *et al.*, 2004; Daniels, 2000; Krottenthaler & Glas, 2009; Fajner, 2010; Gresser, 2010; Kunze, 2004; Sunier, 1988).

1.2.3 LUPPOLO

Il luppolo (*Humulus lupulus*) è una pianta rampicante dioica appartenente alla famiglia delle *Cannabinacee*. Nella maggior parte dei casi il luppolo viene coltivato in forma di pianta femminile non fecondata dal momento che è solo quest'ultima ad avere le caratteristiche ideali per il processo brassicolo. Nello specifico, le infiorescenze femminili (Fig. 3) si ritrovano riuniti in coni disposti a grappolo.



Figura 3 – Infiorescenze femminili della pianta di luppolo

Ciascun fiore, inoltre, si caratterizza per la presenza di una sostanza polverosa gialla: la luppolina; quest'ultima contiene principalmente resine, oli essenziali, tannini e terpeni. Al momento della raccolta il luppolo si caratterizza per una elevata umidità (75 – 80% p/p) e per questo motivo è necessario essiccarlo fino al raggiungimento di un valore di umidità di circa il 10%; solo allora potrà essere considerato idoneo per il processo tecnologico.

Di seguito viene mostrata una tabella (Tab. 4) nella quale viene descritta la composizione chimica dei luppoli essiccati.

Componenti	Quantità % (p/p)
Acqua	10
Resine Totali	15
Oli essenziali	0.5 – 3
Tannini e Polifenoli	4 – 6
Monosaccaridi	2
Pectine	2
Aminoacidi	0.1
Proteine	2
Lipidi e Cere	3
Ceneri	8
Cellulosa e Lignina	40

Tabella 4 – Composizione chimica dei luppoli essiccati espressa in termini quantitativi in percentuale peso / peso. Fonte: European Brewery Convention, 1997.

Le resine rappresentano la porzione più importante dal momento che circa il 90% dell'amaro presente nella birra finita deriva proprio da questa componente ed in particolar modo dagli α – acidi i quali, durante la bollitura del mosto, vanno incontro ad una reazione di isomerizzazione con un conseguente aumento del grado di solubilizzazione.

Infatti è importante sottolineare come gli α – acidi che si ritrovano all'interno della luppolina siano poco solubili nel mosto mentre i loro isomeri (iso α – acidi) lo sono molto di più. Oltre a questa componente abbiamo anche i β – acidi per i quali può essere fatto lo stesso discorso degli alfa; questi, tuttavia, contribuiscono in maniera molto limitata al processo di conferimento della

sensazione di amaro in quanto isomerizzano regolarmente durante la bollitura ma, nonostante ciò, si solubilizzano male nel mosto.

Le resine risultano essere importanti anche da un punto di vista tecnologico in quanto, insieme ai tannini, sono responsabili del miglioramento della stabilità della schiuma; questo avviene grazie, da un lato, a forze di natura ionica tra le cariche negative degli iso α – acidi e quelle positive degli ioni ammonio dei polipeptidi che costituiscono la schiuma e, dall’altro, in seguito alla formazione di complessi metallici (Blanco *et al.*, 2006).

Le resine totali presenti nel luppolo vengono classificate, a seconda del loro grado di solubilità in solventi organici, in resine “molli” e resine “dure”; le prime, solubili in esano ed in idrocarburi paraffinici comprendono α – acidi e β – acidi mentre le seconde, insolubili in idrocarburi paraffinici, includono prodotti di ossidazione degli α / β – acidi (indicati come resine δ e resine ϵ) (Moir, 2000). Tra i principali α – acidi abbiamo umulone, coumulone, adumulone (Fig. 4), con naturalmente, i loro rispettivi isomeri.

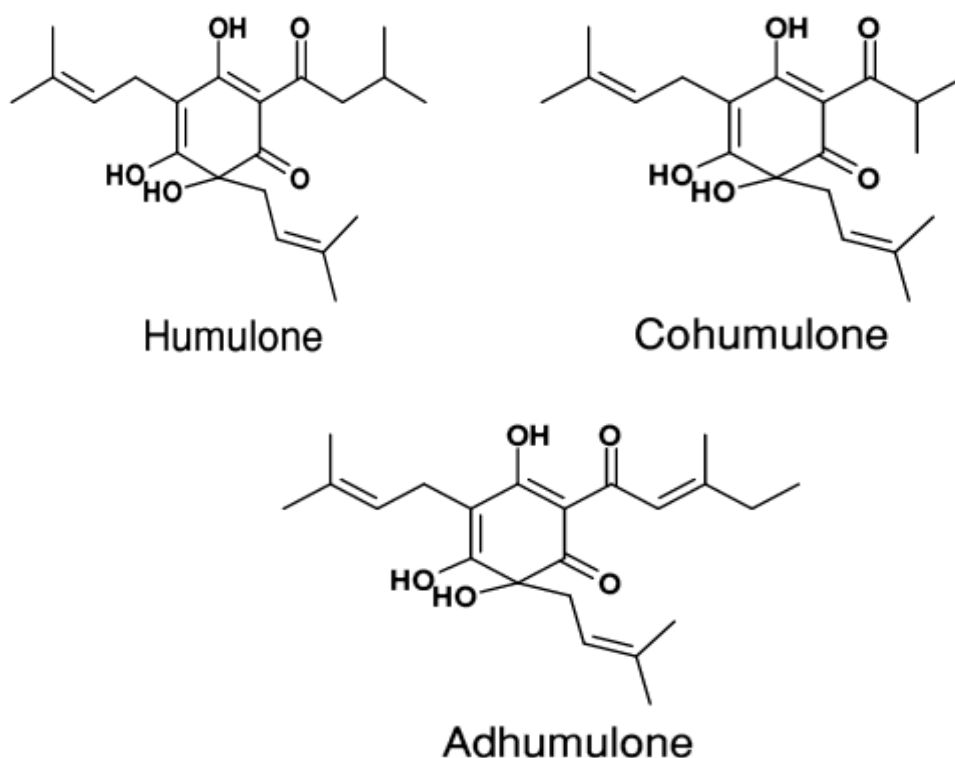


Figura 4 – Strutture chimica dei principali α – acidi presenti nel luppolo

L'umulone, l'alfa acido maggiormente rappresentato, è coinvolto in una serie di processi benefici a livello dell'organismo umano: è in grado di inibire i fenomeni di osteoporosi già a concentrazioni basse, esercitare una spiccata attività infiammatoria ed inibire l'angiogenesi e la crescita incontrollata delle cellule endoteliali (Tobe *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 2000; De Keukeleire, 2003).

Anche gli oli essenziali rappresentano, nel luppolo, una componente molto importante: mentre le resine molli (e quindi principalmente gli α – acidi) vanno a definire le proprietà amaricanti della birra finita, gli oli essenziali invece ne influenzano il gusto e l'aroma; nello specifico ne sono stati individuati più di trecento, la maggior parte dei quali di natura volatile. Da un punto di vista chimico gli oli essenziali sono da considerarsi terpeni (e loro prodotti di ossidazione) tra i quali ricordiamo: monoterpeni (mircene, geraniolo, linalolo, limonene), sesquiterpeni (farnesene, α – umulene e β – cariofillene), esteri (2 – metil propil isobutirrato), acidi carbossilici (acido 2 – metil butirrico) e sulfidi (1,2 epitiumulene) (Moir, 2000). Ad oggi non è ancora ben chiaro se questa classe di composti agisca bioattivamente nei processi biochimici salutistici dell'organismo umano.

Da un'analisi qualitativa è emerso come questi composti, essendo “varietà – dipendenti”, possono essere utilizzati per l'identificazione delle differenti varietà di luppolo (Kovacevic & Kac, 2002).

A seconda della quantità di resine molli ed alla natura degli oli essenziali presenti è possibile quindi differenziare le varie tipologie di luppolo in tre principali varietà, ciascuna delle quali potrà essere poi utilizzata durante il processo brassicolo a seconda del fine tecnologico ricercato; nello specifico abbiamo:

- **Luppoli “da amaro”:** caratterizzati da un elevato contenuto in α – acidi (generalmente superiore al 8% del totale), vengono generalmente aggiunti durante le prime fasi della bollitura in maniera tale da

ottimizzare la resa della reazione di isomerizzazione, aumentando così la solubilità degli α – acidi nel mosto con conferimento della sensazione di amaro. Esempi sono il Chinook (11 – 12%), il Columbus (12 – 16%) ed il Centennial (8 – 11%);

- **Luppoli “amaro - aromatici”:** luppoli nei quali abbiamo un buon compromesso in termini di potere amaricante e contenuto di oli essenziali (in generale in questa tipologia di luppoli il contenuto di α – acidi varia tra il 6 – 8%) e per questo motivo utilizzabili per entrambi gli scopi. Esempi sono il Cascade, il Challenger ed il Cluster;
- **Luppoli “aromatici”:** caratterizzati da un contenuto basso in α – acidi (inferiore al 6%); vengono utilizzati nelle ultime fasi della bollitura del mosto in maniera tale da preservare la parte aromatica e volatile evitando così perdite dovute ad un’eccessiva esposizione alla temperatura di ebollizione. Questi luppoli naturalmente avranno un maggior contenuto in oli essenziali con, nello specifico, un elevato rapporto β – cariofillene / α – umulene. Come esempi citiamo l’Amarillo, l’Hallertau, il Saaz ed il Goldings.

E’ importante sottolineare il fatto che il luppolo può essere aggiunto non solo durante la fase di bollitura del mosto ma anche durante la fase di maturazione a freddo della birra in una fase nota come “Dry Hopping” nella quale generalmente si predilige l’utilizzo dei luppoli aromatici (fase della quale si discuterà nella sezione dedicata al processo produttivo).

Un ulteriore aspetto è legato al fatto che il luppolo può essere utilizzato in differenti “formati”; nello specifico abbiamo:

- **Coni:** costituiti dall’infiorescenza essiccata, sono molto pratici in fase di bollitura e di filtrazione (dove prevista);
- **Plugs:** costituiti da coni interi pressati in “comprese” da 14 g ciascuna, hanno una resa paragonabile a quella dei coni;

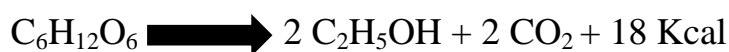
- **Pellets:** costituiti da coni sbriciolati, polverizzati ed infine pressati; nati per soddisfare le esigenze dei grandi impianti industriali si sono progressivamente diffusi anche a livello della realtà artigianali arrivando ad essere la tipologia maggiormente utilizzata. Si caratterizzano per una resa processuale superiore di circa il 10 – 25% rispetto alle forme precedenti dal momento che il pellet, solubilizzandosi in piccoli frammenti nel mosto durante la bollitura, rende disponibili prontamente gli α – acidi per l'isomerizzazione.

1.2.4 LIEVITO

Il lievito è un microrganismo eucariota unicellulare appartenente al regno dei funghi il quale è in grado di respirare e/o fermentare a seconda delle proprie caratteristiche e delle condizioni ambientali entro le quali si ritrova riproducendosi essenzialmente per gemmazione.

Il compito principale del lievito è quello di attivare il processo fermentativo ovvero una serie di reazioni chimiche che, partendo dal glucosio, permettono di ottenere etanolo ed anidride carbonica unitamente alla cessione di una determinata aliquota di energia.

La fermentazione (alcolica) può essere schematizzata dalla seguente reazione (Gay – Lussac):



Nello specifico quindi possiamo affermare che da ogni molecola di glucosio processata si ottengono due molecole di etanolo, due di anidride carbonica con il rilascio di un'aliquota di energia pari a 18 Kcal.

Naturalmente il substrato in cui avviene questo processo è rappresentato dal mosto di birra nel quale etanolo ed anidride carbonica rappresentano i principali prodotti finali presenti; l'attività metabolica del lievito, inoltre, permette di ottenere tutta una serie di metaboliti secondari come ad esempio

aldeidi, chetoni, alcoli superiori, esteri (solo per citarne alcuni) che andranno ad arricchire e caratterizzare il profilo sensoriale della birra finita.

Come specificato dalla normativa vigente, tutti i lieviti impiegati nel processo brassicolo appartengono al genere *Saccharomyces* (Tenge, 2009) e, nello specifico, le specie maggiormente impiegate oggi sono essenzialmente due: *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* (ex *S. carlsbergensis*) (Fig. 5).

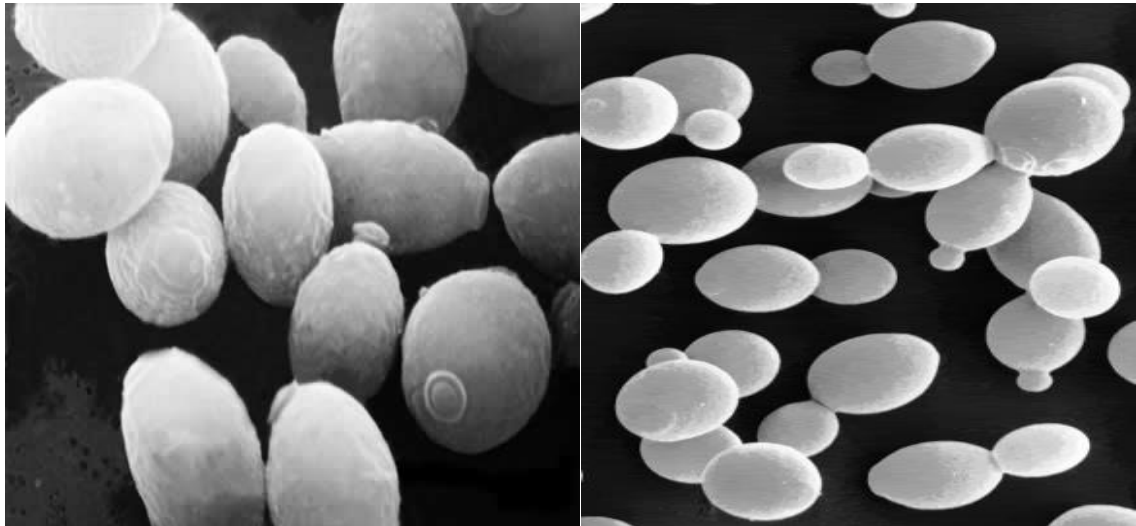


Figura 5 – Cellule di *S. cerevisiae* (immagine a sinistra) e *S. pastorianus* (immagine a destra) osservate al microscopio elettronico.

L'utilizzo di una specie piuttosto che un'altra ci permette di distinguere due metodi differenti di fermentazione del mosto di birra: **“alta fermentazione”** e **“bassa fermentazione”**.

La prima prevede l'impiego del *S. cerevisiae*, una specie che trova ampie applicazioni pratiche nel campo delle tecnologie alimentari non solo nella birra ma anche in prodotti come il vino ed il pane; non meno importante è il ruolo svolto da questa specie nell'ambito della ricerca scientifica in quanto è stata utilizzata sia per studiare fenomeni biochimici come glicolisi e riproduzione cellulare sia per fungere da marker nel processo di mappatura del DNA.

S. cerevisiae ha uno sviluppo ottimale tra i 15 – 25 °C e dopo aver esaurito la propria attività metabolica tenderà a schiumare sulla superficie del tino di

fermentazione grazie alla capacità che questi lieviti hanno di dar luogo a strutture più o meno complesse (costituite da più cellule di lievito legate tra loro) che risalgono sotto l'impulso dell'anidride carbonica formatasi: i mosti fermentati in questo modo diventeranno poi birre “**Ale**”.

La bassa fermentazione si caratterizza invece per l'impiego di *S. pastorianus*, una specie il cui optimum d'azione è compreso tra i 6 – 10 °C e quindi, date le temperature di sviluppo metabolico, con una cinetica fermentativa sicuramente più lenta rispetto a quella esplicitata dai *S. cerevisiae*. A differenza di quest'ultimi poi, i *S. pastorianus* non schiumano in superficie al termine della fermentazione ma tendono a flocculare sul fondo del tino non solo una volta esauritasi l'attività metabolica, ma anche durante tutte le fasi del processo fermentativo stesso. Un mosto fermentato in tal maniera prenderà poi il nome di birra “**Lager**”.

Le terminologie “Ale” e “Lager” vengono oggi normalmente utilizzate per indicare due prodotti completamente differenti (il che sottintende anche implicitamente l'utilizzo di una determinata tipologia di lievito e quindi di un determinato processo fermentativo): con “Ale” si indicano principalmente i prodotti artigianali mentre con “Lager” si fa riferimento a un prodotto di impostazione maggiormente industriale.

Oltre alle alte ed alle basse fermentazioni è possibile individuare altre tipologie di processi fermentativi, più rari, come:

- **Fermentazione spontanea:** sicuramente la forma più antica, viene chiamata in questo modo in quanto non vengono aggiunti lieviti al mosto dal momento che è l'ambiente della sala di fermentazione (generalmente cantine) a fornire i microrganismi catalizzanti il processo fermentativo. E' un metodo molto complesso e sensibile poiché è estremamente suscettibile alle influenze esterne ambientali. Il processo può essere condotto a varie temperature anche se è meglio in questo caso condurlo a temperature da bassa fermentazione in modo

tale da preservare meglio il mosto. Le birre a fermentazione spontanea più famose ed oggi molto rare sono le “**Lambic**”, tipiche della zona di Bruxelles;

- **Fermentazione ibrida:** metodo che sfrutta una particolare tipologia di lievito non convenzionale rappresentato dal *Saccharomyces delbrueckii* noto anche come “lievito *weizen*” il quale viene utilizzato per produrre principalmente birre di frumento tedesche;
- **Fermentazione da microrganismi non *Saccharomyces*:** processo fermentativo dovuto alla presenza di microrganismi del tipo *Brettanomyces bruxellensis* (usato generalmente in combinazione con un altro lievito o batterio), *Brettanomyces lambicus* (caratterizzato da una cinetica estremamente lenta), *Pediococcus damnosus* (microrganismo solitamente indesiderato in quanto responsabile della produzione di diacetile, può essere comunque utilizzato in particolari situazioni). Questi si ritrovano soprattutto nell’ambito delle fermentazioni spontanee in cui vengono coinvolti anche microrganismi non saccaromiceti.

1.3 PROCESSO PRODUTTIVO

Il processo produttivo della birra è rimasto sostanzialmente invariato nel corso dei secoli anche se, ovviamente, alcuni aspetti sono mutati in relazione soprattutto alla natura delle attrezzature disponibili (ieri in legno, oggi in acciaio), alla gestione delle temperature di processo ed a una maggiore attenzione alla sanitizzazione.

Oggi, in linea generale, i processi produttivi (artigianali ed industriali) si caratterizzano per un'impostazione concettuale molto simile; tuttavia, come già ribadito nel paragrafo 1.1.4, il prodotto artigianale è completamente differente da quello industriale dal momento che nel primo non vengono effettuate fasi come la filtrazione della birra finita prima dell'imbottigliamento con successiva pastorizzazione, tenendo anche presente il fatto che, nelle produzioni artigianali, c'è la possibilità di gestire in maniera più versatile una fase importantissima come la fermentazione secondaria (detta anche maturazione a freddo). Di seguito viene mostrata una figura (Fig. 6) nella quale vengono rappresentate tutte le operazioni effettuabili durante processo produttivo della birra.

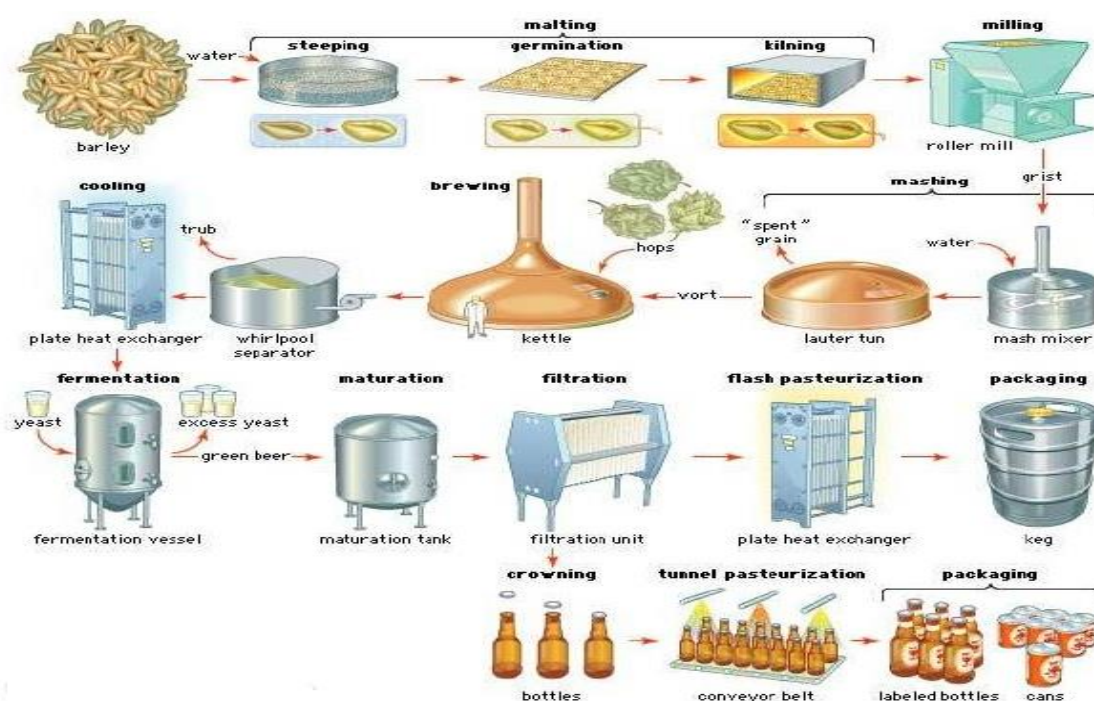


Figura 6 – Fasi del processo produttivo della birra.

Dal momento che le ricette brassicole oggetto del seguente lavoro di tesi sono prodotte seguendo l'impostazione artigianale del processo produttivo ci concentreremo sul descrivere le principali fasi di tale approccio. Quest'ultime comprendono: maltatura, ammostamento, risciacquo delle trebbie, bollitura e fermentazione.

1.3.1 MALTATURA

La maltatura (o maltazione) è una fase fondamentale dal momento che permette di ottenere un arricchimento del patrimonio enzimatico della cariosside del cereale (principalmente l'orzo) grazie ad una germinazione controllata della stessa. Nello specifico, grazie a questa fase l'orzo viene trasformato in malto.

Un aspetto importante da sottolineare è relativo al fatto che, ancora oggi, è estremamente raro trovare uno stretto legame tra la produzione del malto e la produzione della birra; in particolar modo, nell'ultimo secolo queste due attività hanno seguito un percorso differente specializzandosi ciascuna all'interno del proprio ambito: da un lato abbiamo le malterie specializzate nel processo di maltatura mentre dall'altro troviamo i birrifici nei quali avviene la lavorazione delle materie prime dalle quali si otterrà la birra.

La tendenza della gran parte dei birrifici in Italia è quindi quella di utilizzare, per la produzione, orzi maltati (o comunque cereali già sottoposti ad una lavorazione funzionale a quello che sarà poi l'utilizzo dello stesso nel processo tecnologico) all'interno di malterie che non hanno nella maggior parte dei casi nessun tipo di legame con il birrificio richiedente la materia prima stessa; le uniche eccezioni a questa prassi sono rappresentate da un lato dalle grandi multinazionali che dispongono di proprie malterie e dall'altro dall'emergente realtà rappresentata dai birrifici agricoli.

Gli scopi della maltatura sono essenzialmente di natura tecnologica: in primo luogo, come detto in precedenza, abbiamo un arricchimento del patrimonio

enzimatico della cariosside soprattutto grazie alla produzione, nella stessa, di enzimi amilolitici (α – amilasi e β – amilasi) necessari alla saccarificazione dell'amido e di enzimi proteolitici (peptidasi e proteasi) grazie ai quali verranno poi processate le strutture proteiche; durante la maltatura il corredo enzimatico del cereale può essere arricchito anche dalla presenza di enzimi come destrinasi, xilanasi, eso/endo – β – glucanasi ed anche lipasi (Pepe, 2010).

In secondo luogo, grazie ad una delle fasi del processo di maltatura e cioè la tostatura, sarà possibile ottenere dei malti caratterizzati da differenti colorazioni e profili aromatici i quali potranno essere utilizzati a seconda dello stile e del prodotto finale che si vorrà ottenere; ancora, la produzione del malto permette di ottenere cariossidi più friabili e quindi più facili da lavorare.

La tecnologia di produzione del malto d'orzo si articola in quattro fasi fondamentali:

- **Pulitura e calibratura dell'orzo:** fase nella quale le cariossidi vengono pulite mediante ventole, magneti ed aspiratori in maniera tale da scongiurare l'eventuale presenza di sostanze estranee con una successiva calibratura grazie alla quale si otterranno cariossidi di grandezza standard;
- **Macerazione:** durante questa fase le cariossidi vengono sottoposte a più cicli di immersione in vasche cilindriche contenenti acqua a pH alcalino mantenuta ad una temperatura variabile tra i 12 – 16 °C così da contrastare l'eventuale sviluppo di microrganismi; questa fase dura mediamente 48 ore in modo tale da determinare un aumento del grado di umidità delle cariossidi quantificabile in un range compreso tra il 42 – 47% (Sicheri, 1983). Inoltre è molto importante, durante tutta la durata della fase di macerazione, rinnovare ad intervalli regolari

(generalmente ogni 8/12 ore) l'acqua nelle vasche così da prevenire fenomeni di ammuffimento indesiderati;

- **Germinazione:** una volta conclusa la macerazione delle cariossidi, quest'ultime vengono disposte solitamente in germinatoi a griglie (ma anche su enormi pavimenti) e lasciate per circa 5 – 7 giorni, ad una temperatura variabile tra 15 – 19 °C, sotto un'areazione continua in modo da rimuovere l'anidride carbonica formatasi. E' durante questo intervallo di tempo che prende avvio il vero processo di germinazione delle cariossidi (anche se in parte si innesca già durante la fase di macerazione) grazie al quale si assiste alla sintesi di ormoni di crescita nell'embrione che vengono inviati allo strato aleuronico il quale, a sua volta, attiverà la sintesi delle differenti componenti enzimatiche; al fine di indurre la sintesi si può procedere anche aumentando lentamente, in un intervallo di tempo di 25 ore, la temperatura di germinazione arrivando vicino anche ai 30°C (questa operazione, se effettuata, viene generalmente condotta durante le fasi finali della germinazione e quindi rappresenta un punto di collegamento con la successiva fase di essiccamento) (Cantoni, 1990). Germinando le cariossidi non sintetizzano soltanto enzimi, ma anche sostanze oleose le quali vengono però allontanate dal momento che agiscono da agenti antischiuma.

Con il procedere della germinazione si assiste allo sviluppo degli embrioni i quali dopo qualche giorno tenderanno a “fuoriuscire” dalle cariossidi stesse dando luogo ad una radichetta (fenomeno noto come “tallitura”); parallelamente allo sviluppo di quest'ultima si comincerà a notare anche una piumetta sul dorso della cariosside stessa. In questa fase sarà molto importante rivoltare i chicchi ad intervalli regolari (circa ogni 12 ore) in modo tale da favorire una corretta areazione e quindi una germinazione uniforme.

Questa fase si protrarrà fin quando le radichette non avranno raggiunto una lunghezza pari a 1.5 (malti chiari) – 2 volte (malti scuri) quella delle cariossidi con quest'ultime che avranno assunto un colore verde intenso (a questo livello si parla di malto verde);

- **Essiccamento e tostatura:** rappresentano gli step conclusivi della maltatura. Con l'essiccamento il malto verde viene asciugato per 12 ore ad una temperatura di circa 50 °C grazie alla quale vengono preservati gli enzimi precedentemente sintetizzati; una volta terminato questo primo step, le cariossidi vengono poi tostate e cioè sottoposte ad un trattamento termico ad elevata temperatura grazie al quale si possono ottenere differenti profili in termini di colore e aroma a seconda della tipologia di malto che si vuole produrre (Fig. 7) (Wolf – Hall, 2007). La tostatura viene condotta in funzione dei parametri tempo – temperatura (quindi si può tostare ad una temperatura standard per un determinato intervallo di tempo oppure, ad esempio, condurre l'operazione ad una data temperatura che viene poi aumentata nella fasi finali dando luogo al cosiddetto “colpo di calore”); in generale per i malti chiari e/o base si utilizzano range di temperatura compresi tra 60 – 80 °C mentre per i malti scuri e/o caratterizzanti si utilizzeranno temperature che possono arrivare anche a sfiorare i 200 °C in maniera tale da stimolare maggiormente la cinetica della reazione di Maillard (responsabile dell'imbrunimento non enzimatico) grazie alla quale le cariossidi acquisiscono colori più accentuati e profili aromatici più decisi.

Grazie a queste ultime operazioni si assiste ad una progressiva diminuzione del grado di umidità delle cariossidi le quali passeranno dal 42 – 47% di fine macerazione al 4% del malto finito (Pirova, 1973).

Come ultimi passaggi il malto viene prima privato delle radichette (essiccamento e tostatura hanno anche lo scopo di favorire questa operazione) per prevenire la comparsa di sapori amari sgradevoli e successivamente stoccato in silos o depositi per alcune settimane in maniera tale da favorire una ridistribuzione dell'umidità residua; da lì verrà poi distribuito ai birrifici richiedenti la materia prima (Cantoni, 1990).



Figura 7 – Differenti tipologie di malti.

1.3.2 AMMOSTAMENTO

Una volta che il malto raggiunge il birrificio può essere utilizzato per il processo produttivo; innanzitutto si macinano grossolanamente le cariossidi (una macinatura eccessivamente spinta renderebbe difficoltoso il successivo risciacquo delle trebbie) in modo tale da favorire l'estrazione delle componenti solubili e l'azione degli enzimi, dopodiché vengono miscelate all'interno di una caldaia specifica (ammostante) contenente acqua riscaldata leggermente acida (Zambonelli *et al.*, 1999); prende così il via in questo modo la fase di ammostamento.

Durante l'ammontamento si assiste principalmente alla digestione delle proteine ed alla saccarificazione dell'amido grazie al controllo della

temperatura, del pH e del tempo di permanenza della miscela ad un determinato valore termico andando così ad influenzare l'attività degli enzimi prodotti con la maltatura. In questo modo si possono estrarre tutti quei metaboliti che andranno ad influenzare le caratteristiche del prodotto finito (grado alcolico, corposità, gusto ed aroma).

Le classi di enzimi più importanti durante l'ammontamento sono essenzialmente due: enzimi proteolitici (proteasi e peptidasi) ed enzimi diastatici (α – amilasi e β – amilasi). Proteasi e peptidasi, attive a temperature più basse, vanno ad idrolizzare le proteine in peptidi a basso peso molecolare con successiva liberazione di amminoacidi in singola forma andando così ad influenzare da un lato, la formazione della schiuma e dall'altro, l'attività dei lieviti i quali potranno sfruttare gli amminoacidi per il loro metabolismo (Wolf – Hall, 2007); le α – amilasi e β – amilasi, attive invece a temperature più elevate, promuovono, come detto in precedenza, la saccarificazione dell'amido con modalità tuttavia differenti: le prime attaccano, in modo casuale, i legami α – 1,4 – D – glucosidici presenti nelle porzioni più interne dell'amido (e per questo conosciute anche come endoamilasi) liberando essenzialmente zuccheri non (o meno) fermentescibili come le destrine responsabili dell'aumento del corpo della birra mentre le seconde, più specifiche, scindono i legami α – 1,4 – D – glucosidici presenti nelle porzioni più esterne dell'amido (si parla in questo caso anche di esoamilasi) liberando zuccheri fermentescibili come il maltosio dal quale si otterrà l'etanolo (Pirova, 1973).

E' fondamentale sottolineare come l'utilizzo delle lettere alfa e beta non faccia riferimento alla natura del legame idrolizzato ma bensì all' iniziale conformazione anomerica dello zucchero rilasciato (nello specifico le β – amilasi producono β – maltosio grazie ad una inversione). Di seguito viene mostrata una tabella riassuntiva (Tab. 5) contenente le

caratteristiche fondamentali dei principali enzimi attivi durante la fase di ammostamento.

Enzima	Optimum T	Optimum pH	Funzione
Proteasi e Peptidasi	45 – 55 °C	4.6 – 5.2	Proteolisi
β – amilasi	58 – 63 °C	5.2 – 5.6	Degradazione amido (maltosio)
α – amilasi	68 – 73 °C	5.4 – 5.8	Degradazione amido (destrine)

Tabella 5 – Principali enzimi attivi durante l’ammostamento.

Oltre agli enzimi sopra descritti è possibile individuare ulteriori strutture enzimatiche che, teoricamente, potrebbero essere sfruttate durante la fase di ammostamento; esempi sono rappresentati da fitasi e β – glucasi. L’evoluzione del processo produttivo della birra tuttavia ha fatto sì che il ruolo di questi enzimi possa essere trascurato; questo perché l’azione delle fitasi (acidificazione del mosto) può essere sostituita dall’aggiunta dell’acido lattico o cloruro di calcio nel momento in cui si dovesse rendere necessario un aggiustamento del pH mentre l’azione svolta dalle β – glucasi (e cioè la degradazione dei β – glucani) viene anticipata ed effettuata con la maltatura. Questo permette quindi di poter concentrare l’attenzione, in relazione alla gestione dei principali parametri di processo (temperatura e pH), sugli enzimi fondamentali della fase di ammostamento.

L’ammostamento può essere infine condotto sfruttando due modalità:

- **Ammostamento per “infusione”:** metodo più recente e maggiormente utilizzato sia a livello industriale che artigianale in quanto semplice (può essere condotto infatti in un unico ammostatore) e non eccessivamente costoso. In linea generale prevede un riscaldamento progressivo della miscela di acqua e malto con opportune soste a valori di temperatura specifici protratte per tempi prestabiliti in maniera tale da permettere agli enzimi di esplicare la

propria funzione catalitica; durante la sosta è importantissimo mantenere la miscela in agitazione in modo tale da evitare, all'interno della stessa, la creazione di zone con temperature differenti che potrebbero alterare la corretta attività degli enzimi.

Riassumendo quindi, il concetto di fondo del metodo per infusione prevede l'innalzamento della temperatura al valore desiderato ed il riposo della miscela per un tempo prestabilito (fase di sosta) al termine del quale si procederà con un nuovo incremento termico fino al raggiungimento del successivo valore di temperatura desiderato in cui avverrà una nuova fase di sosta;

- **Ammostamento per “decozione”:** metodo più antico e complesso utilizzato oggi soltanto in determinati birrifici (maggiormente tedeschi). Questo metodo consiste nell'andare a prelevare una parte della miscela, trasferirla in un bollitore, portarla all'ebollizione e ritrasferirla nell'ammostatore facendo sì che l'intera miscela raggiunga la temperatura desiderata lasciandola quindi riposare in modo tale da far lavorare gli enzimi; una volta terminata la sosta si procederà allo stesso modo così da indurre un nuovo innalzamento termico della miscela per una nuova fase di sosta. In questo caso sarà necessario avere a disposizione un impianto dotato, oltre che del classico bollitore da mosto, di un ulteriore tino per la bollitura di parte della miscela durante l'ammostamento. Il metodo per decozione garantisce un'intensa e completa gelatinizzazione dell'amido con una maggiore degradazione enzimatica, un aumento della resa di processo ed una maggior produzione di melanoidine che vanno ad influenzare gusto, aroma e colore; parallelamente l'ebollizione di parte della miscela può indurre fenomeni di tipo ossidativo a seguito dell'entrata di aria indesiderata.

Qualsiasi sia la modalità utilizzata, la temperatura dell'intera miscela di acqua e malto non dovrà mai essere superiore ai 78 °C; a questa temperatura infatti si ha l'inattivazione degli enzimi e la stabilizzazione della saccarificazione ed è questo il motivo per il quale l'ultima sosta termica della fase di ammostamento viene sempre condotta a questa temperatura (in questo caso si parla solitamente di fase del “mash – out”).

1.3.3 RISCIAQUO DELLE TREBBIE

Una volta terminata la fase di ammostamento la miscela viene scaricata all'interno di un tino di chiarificazione o filtrazione in modo tale da poter separare la frazione liquida (il mosto di birra) da quella solida (trebbie): questa fase è per l'appunto nota come risciacquo delle trebbie. Il sistema maggiormente utilizzato, conosciuto come “lauter tun”, consiste nel trasferire la miscela di mosto di birra e trebbie all'interno di un tino dotato di un falso fondo provvisto di fenditure (Zambonelli *et al.*, 1999). La miscela viene pompata dal basso al fine di ridurre al minimo fenomeni di natura ossidativa e man mano che si procede con questa fase, si verrà a formare un “letto” di trebbie (Cantoni, 1990); quest'ultimo svolge la funzione di filtro naturale: il mosto di birra viene fatto drenare, attraverso le trebbie stesse, nel falso fondo e da qui inviato al bollitore. Per aumentare la resa del processo è possibile utilizzare, durante questa fase, uno stratagemma noto come “**sparging**” il quale consiste nel lavare ulteriormente le trebbie con aggiunte regolari di acqua in modo tale da esaurire completamente la frazione solida ed arricchire il mosto di birra di tutti i metaboliti estratti durante la precedente fase di ammostamento che si ritrovano ancora sospesi nella miscela (soprattutto gli zuccheri fermentescibili) (Krottenthaler *et al.*, 2009). Durante questa fase è opportuno curare due aspetti: in primo luogo le caratteristiche dell'acqua utilizzata per lo sparging dal momento che quest'ultima dovrà avere valori, in termini di temperatura e di pH, pressoché

uguali rispetto alla miscela in separazione (generalmente l'acqua per lo sparging viene riscaldata fino a 78 °C e acidificata ad un pH non superiore ai 5.7); in secondo luogo sarà necessario, prima di procedere al risciacquo vero e proprio, chiarificare il mosto utilizzando un ulteriore stratagemma noto come “ricircolo del mosto”; quest'ultimo viene realizzato scaricando più volte determinate quantità di mosto le quali, invece di essere inviate al bollitore, vengono riposte nel tino di chiarificazione. Una volta raggiunto il giusto grado di chiarificazione si potrà procedere con il vero risciacquo delle trebbie al termine del quale avremo da un lato, il mosto di birra limpido all'interno del bollitore e dall'altro, le trebbie esauste (Fig. 8) che posso essere sia smaltite sia utilizzate dal settore mangimistico.



Figura 8 – Trebbie esauste al termine della fase di risciacquo.

1.3.4 BOLLITURA DEL MOSTO

Una volta raccolto tutto il mosto all'interno del bollitore, questo viene portato alla temperatura di ebollizione e mantenuto in queste condizioni per un tempo variabile tra i 60 ed i 120 minuti (mediamente la durata della bollitura si aggira intorno ai 90 minuti). L'operazione fondamentale che viene condotta durante la bollitura del mosto consiste nell'aggiunta del

luppolo in modo tale da conferire, al mosto prima ed alla birra finita poi, amaro, gusto ed aroma (Vitagliano, 2002).

Il luppolo può essere aggiunto a dosaggi ed in momenti differenti in funzione delle caratteristiche che si vogliono ottenere nella birra finita: la quantità utilizzata può variare dai 2 ai 5 g/L mentre le aggiunte vengono generalmente effettuate ad inizio bollitura, per conferire al prodotto l'amaro e nelle fasi finali (ma anche al termine, una volta cessati i moti vorticosi del mosto), per imprimere alla birra un determinato sapore e/o aroma in funzione del tipo di luppolo utilizzato. A tal proposito è importante sottolineare che, proprio nelle fasi finali o al termine della bollitura, possono essere aggiunti al mosto ulteriori ingredienti come ad esempio spezie di varia natura o il miele proprio per conferire alla birra finita un'ulteriore caratteristica sensoriale.

Da un punto di vista tecnologico la bollitura rappresenta una fase estremamente importante dal momento che è proprio durante questo step del processo produttivo che si realizzano una serie di trasformazioni che contribuiranno, unitamente all'attività metabolica del lievito, alla conversione del mosto in birra finita; nello specifico abbiamo:

- **Isomerizzazione degli α – acidi e solubilizzazione degli oli essenziali del luppolo:** la bollitura induce una reazione di isomerizzazione degli α – acidi rendendoli così maggiormente solubili nel mosto; contemporaneamente si assiste all'estrazione degli oli essenziali presenti nel luppolo. La reazione di isomerizzazione degli α – acidi si caratterizza per una resa molto bassa ed è questo il motivo per il quale (come anticipato nel paragrafo 1.2.3) i luppoli da “amaro” vengono aggiunti all'inizio della bollitura mentre quelli da “aroma” si utilizzano nelle fasi finali o al termine della stessa in modo tale da preservare la porzione volatile costituita dagli oli essenziali;
- **Chiarificazione del mosto:** durante la bollitura i composti fenolici del luppolo e del malto presenti nel mosto si combinano con le strutture

proteiche dando luogo a complessi ad elevato peso molecolare che tendono a precipitare;

- **Concentrazione del mosto ed eliminazione di sostanze indesiderate:** l'ebollizione permette da un lato, l'evaporazione di parte dell'acqua e dall'altro, l'allontanamento di sostanze indesiderate come il Dimetil solfuro (DMS);
- **Sterilizzazione del mosto:** durante l'ebollizione vengono eliminati tutti quei microrganismi che potrebbero adulterare il mosto durante la fermentazione;
- **Inattivazione enzimatica:** il trattamento termico degrada le eventuali strutture enzimatiche ancora presenti;
- **Colorazione del mosto:** le alte temperature stimolano la reazione di Maillard con conseguente imbrunimento del colore del mosto causato soprattutto dalla formazione delle melanoidine.

Una volta terminata la bollitura il mosto subisce una pseudo centrifugazione mediante la creazione di un vortice in un'operazione nota come “**whirlpool**”; quest'ultima può essere condotta all'interno del bollitore oppure trasferendo il mosto stesso in un tank cilindrico col fondo leggermente inclinato provvisto di un ingresso tangenziale dal quale il liquido viene pompato alla velocità di circa 3 – 5 m/s (Briggs *et al.*, 2004). Lo scopo del whirlpool è quello di chiarificare ulteriormente il mosto in maniera tale da renderlo limpido il più possibile prima di procedere al trasferimento nel fermentatore. Durante il trasferimento il mosto viene raffreddato mediante l'utilizzo di scambiatori a piastre in contro flusso alimentati generalmente ad acqua o mediante soluzioni refrigeranti come glicole etilenico e propilenico. Con il raffreddamento il mosto passerà da una temperatura iniziale vicino ai 100 °C ad un valore finale (nel fermentatore) dipendente dal tipo di lievito da inoculare in funzione del tipo di fermentazione da adottare (Eßlinger, 2009).

1.3.5 FERMENTAZIONE

Non appena viene completato il trasferimento del mosto all'interno del fermentatore si procede con l'inoculo del lievito; prima di ciò, tuttavia, è necessario garantire un certo grado di ossigenazione del mosto in quanto, sebbene la fermentazione alcolica decorra in anaerobiosi, il lievito necessita di una determinata quantità di ossigeno per sintetizzare componenti importantissimi della propria membrana cellulare come steroli ed acidi grassi insaturi fondamentali per la propria crescita.

Il lievito viene aggiunto direttamente nel fermentatore dopo essere stato opportunamente propagato (se in forma liquida) o reidratato (se si utilizzano lieviti secchi attivi) con un tasso di inoculo che può raggiungere $10^6 - 10^7$ cellule/ml.

La fermentazione del mosto di birra può essere suddivisa in due fasi:

- **Fermentazione primaria o “tumultuosa”:** in questa fase, della durata variabile tra i due ed i dieci giorni, si assiste principalmente alla metabolizzazione degli zuccheri con produzione di etanolo ed anidride carbonica; parallelamente, grazie all'attività del lievito, si avrà la produzione di tutta una serie di composti secondari come alcoli superiori, esteri, acidi organici e composti carbonilici (aldeidi e chetoni);
- **Fermentazione secondaria o “maturazione a freddo”:** fase che può avvenire all'interno del fermentatore stesso oppure in specifici tank di maturazione durante la quale si assiste ad un abbattimento progressivo della temperatura in maniera tale da migliorare la qualità del prodotto. Con la maturazione a freddo, infatti, abbiamo tutta una serie di fenomeni quali: saturazione dell'anidride carbonica, chiarificazione naturale della birra grazie alla precipitazione dei complessi tanno – proteici e delle cellule di lievito, miglioramento del gusto con

armonizzazione della sensazione di amaro e della componente aromatica.

La fermentazione viene condotta all'interno di tini di fermentazione conico – cilindrici i quali garantiscono un miglior accumulo della componente sedimentata con scarichi dal fondo del fermentatore più agevoli.

Come anticipato nel paragrafo 1.2.3 dedicato al luppolo è possibile, durante la maturazione a freddo, effettuare un'ulteriore aggiunta di luppolo; questa operazione è per l'appunto nota come “Dry Hopping” e viene molto adoperata nell'ambito della birra artigianale. Ancora, il lievito non rappresenta l'unico microrganismo che può essere utilizzato nel processo brassicolo infatti, come regolamentato dal D.M. 2 Maggio 1996, n° 325) la legislazione italiana permette l'impiego anche di batteri lattici del genere *Lactobacillus* come stabilizzanti; in particolar modo è utilizzato *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* aggiunto, ad esempio, prima della luppolatura del mosto (Lowe and Arendt, 2004).

Una volta conclusa la fermentazione la birra artigianale (“ale”) viene direttamente imbottigliata, etichettata e distribuita mentre per le “lager” (birre industriali) verranno effettuate due ulteriori fasi: filtrazione e pastorizzazione; solo a questo punto il prodotto potrà essere venduto.

1.4 RUOLO ED IMPORTANZA DEGLI ANTIOSSIDANTI

L'ossigeno rappresenta un elemento essenziale per la sopravvivenza delle cellule dell'organismo umano dal momento che viene utilizzato come substrato per la produzione di energia attraverso le reazioni della respirazione cellulare. Dalla reazione di utilizzazione dell'ossigeno (ossidazione), tuttavia, si producono una serie di prodotti potenzialmente dannosi: i radicali liberi.

Il potenziale ruolo dannoso dei radicali liberi è legato al fatto che, da un punto di vista chimico, queste molecole presentano uno o più elettroni spaiati nell'orbitale più esterno e per questo motivo sono estremamente reattive ed alla continua ricerca di una condizione di stabilizzazione ed equilibrio chimico. L'elevata reattività delle strutture radicaliche può dar luogo a reazioni molto spesso indesiderate e dannose per quanto riguarda l'integrità di cellule, tessuti ed organi (Cestaro, 1994; Berliner & Heinecke, 1996; Wisemann & Halliwell, 1996; Mitscher *et al.*, 1997; Lobo *et al.*, 2010).

Tra le molecole maggiormente reattive troviamo le cosiddette "specie reattive dell'ossigeno" (ROS) le quali includono, soprattutto, il radicale superossido (O_2^-), il radicale ossidrilico (OH^\bullet) ed il perossido d'idrogeno (H_2O_2). Le ROS vengono principalmente prodotte a livello dei mitocondri dove, per l'appunto, avvengono i processi ossidativi con trasporto di elettroni nei quali l'ossigeno, agendo da accettore finale di elettroni per la produzione di energia sotto forma di ATP, va incontro ad una serie di riduzioni con la conseguente formazione dei vari intermedi radicalici. Nelle cellule vegetali la formazione potenziale di ROS avviene anche nei cloroplasti.

Altre vie endogene dalle quali possono svilupparsi le ROS sono rappresentate dalla sintesi degli eicosanoidi (leucotrieni, trombossani, e prostaglandine) a partire dall'acido arachidonico e dall'attività dei macrofagi in cui il radicale superossido viene utilizzato per eliminare batteri e virus. Oltre ai meccanismi endogeni, è possibile individuare fattori esogeni

stimolanti la sintesi di strutture radicaliche; esempi sono rappresentati da fumo, stress, diete sbilanciate, alcool, inquinamento e radiazioni solari. Nello specifico, una quantità eccessiva di ROS a livello dell'organismo umano può incidere in maniera determinante sullo sviluppo di malattie croniche, neurodegenerative, cardiovascolari (sclerosi multipla, diabete, cataratta, arteriosclerosi, morbo di Parkinson, morbo di Alzheimer, dermatiti, distrofia muscolare, ischemia, ipertensione) e sullo sviluppo di forme tumorali (Ames, 1983; Halliwell & Gutteridge, 1990; Cestaro, 1994; Chen *et al.*, 1995; Stocker, 1999; Benzie, 2000; Brieger *et al.*, 2012).

Un fondamentale elemento di difesa nei confronti dei danni causati dai radicali liberi è rappresentato dalla presenza delle molecole antiossidanti.

In generale gli antiossidanti vengono definiti come “qualsiasi sostanza che, presente in bassa concentrazione rispetto ad un substrato ossidabile, è in grado di rallentare o inibire l'ossidazione di quel substrato” (Halliwell, 1995; Antolovich *et al.*, 2002).

Generalmente le molecole antiossidanti possono essere classificate in base a due criteri: da un lato abbiamo caratteristiche strutturali e provenienza mentre dall'altro il loro meccanismo d'azione; nel primo caso distinguiamo gli antiossidanti endogeni come sistemi enzimatici (superossido dismutasi, superossido catalasi, glutazione perossidasi) e non enzimatici (glutazione e seleno – proteine) dagli antiossidanti esogeni (vitamine e composti non vitaminici quali carotenoidi e polifenoli) mentre nel secondo caso abbiamo antiossidanti primari o “preventivi” e antiossidanti secondari o “*chain – breaking*”. I primari limitano l'azione delle ROS trasformandole in strutture meno reattive (ad esempio il sistema della superossido dismutasi), chelando metalli di transizione o rigenerando altri antiossidanti (come nel caso del glutazione o della vitamina C) mentre i secondari sono dotati di una o più strutture aromatiche in grado di cedere elettroni permettendo così al radicale di raggiungere una condizione di equilibrio e bassa reattività con

contemporanea stabilizzazione per risonanza della molecola antiossidante (è il caso dei polifenoli).

In relazione al prodotto birra, il contributo in termini di molecole ad attività antiossidante è legato principalmente all'utilizzo del malto e del luppolo. Per quanto riguarda il ruolo svolto dal lievito ad oggi non esistono studi condotti in tal senso; questo aspetto è dovuto probabilmente al fatto che la quasi totalità degli studi condotti sull'attività antiossidante della birra sono stati effettuati su prodotti Lager, quindi filtrati e pastorizzati, dove viene eliminata qualsiasi traccia del lievito e dei micronutrienti in esso contenuti.

Per questo motivo l'attenzione viene di seguito concentrata sul ruolo svolto, in termini di attività antiossidante della birra artigianale, da materie prime quali il malto ed il luppolo.

1.4.1 GLI ANTIOSSIDANTI DEL MALTO

La fase di maltatura, oltre all'arricchimento enzimatico, determina la sintesi di nuove sostanze grazie soprattutto all'innesco della reazione di Maillard durante la tostatura delle cariossidi precedentemente germinate.

La reazione di Maillard (Fig. 9) consiste in una serie complessa di fenomeni, la cui cinetica è direttamente proporzionale al valore della temperatura, che si sviluppano in tutti gli alimenti e in materie prime opportunamente trattate in cui sono presenti zuccheri riducenti e gruppi amminici liberi. In generale, i prodotti finali della reazione di Maillard, le melanoidine, sono responsabili della comparsa del colore e per questo motivo è conosciuta anche come reazione di "imbrunimento non enzimatico".

Nel processo brassicolo è estremamente importante in quanto, essendo soddisfatte le condizioni di innesco, svolge un ruolo cruciale nel conferimento di colore ed aroma a livello delle cariossidi maltate; in funzione della tipologia di malto da produrre infatti, si agirà sulla

temperatura di tostatura in modo tale da stimolare una maggiore o minore sintesi dei prodotti finali della reazione (Paragrafo 1.3.1).

Da un punto di vista biochimico la reazione di Maillard può essere suddivisa in tre step:

- **Step I:** la reazione tra il carbonio carbonilico dello zucchero riducente ed il gruppo amminico di un amminoacido determina la formazione di un intermedio noto come glicosilammina (quest'ultima è classificabile all'interno delle basi di Schiff in quanto caratterizzata dalla presenza del gruppo funzionale $C=N$); quest'ultima subisce un riarrangiamento dei doppi legami che porterà alla formazione del “composto di Amadori” o di “Heynes” a seconda che lo zucchero riducente sia un aldoso o un chetoso. In ogni caso, questa reazione è conosciuta come “riarrangiamento di Amadori – Heynes” ed è sempre catalizzata dalla presenza degli acidi.

Questi intermedi sono estremamente stabili ed in alcuni prodotti (ad esempio il latte sterilizzato) possono già essere considerati come prodotti finali della reazione. A questo livello tuttavia, non abbiamo la sintesi di composti colorati ed aromatici;

- **Step II:** in questa fase possiamo avere un gran numero di reazioni molto complesse influenzate non solo dalla temperatura, ma anche dal pH. I composti di Amadori – Heynes possono essere disidratati, scissi o utilizzati come substrato per la sintesi di vari composti dicarbonilici; in quest'ultimo caso il substrato va incontro ad una reazione di enolizzazione che lo converte in enolo; quest'ultimo, a questo punto, potrà ciclizzare, scindersi o legarsi ad altri metaboliti come amminoacidi liberi (in questo caso viene innescata una reazione conosciuta come “degradazione di Strecker”) a seconda delle condizioni dell'ambiente di reazione (in termini di temperatura e pH);

- **Step III:** in quest'ultima fase si assiste al più alto grado di imbrunimento del substrato grazie alla sintesi delle melanoidine a seguito della condensazione dei composti a basso peso molecolare precedentemente formati.

Le melanoidine ($C_{17-18}H_{26-27}O_{10}N$) sono sostanze insolubili, ad elevato peso molecolare con contenuto variabile di azoto dotate di una colorazione che può andare dal giallo chiaro al marrone scuro. Queste possono essere infine classificate in due categorie: si parla di “melanoproteine” e “melanoidine propriamente dette” a seconda che il corpo della molecola sia principalmente costituito da proteine o polisaccaridi (Hodge, 1953).

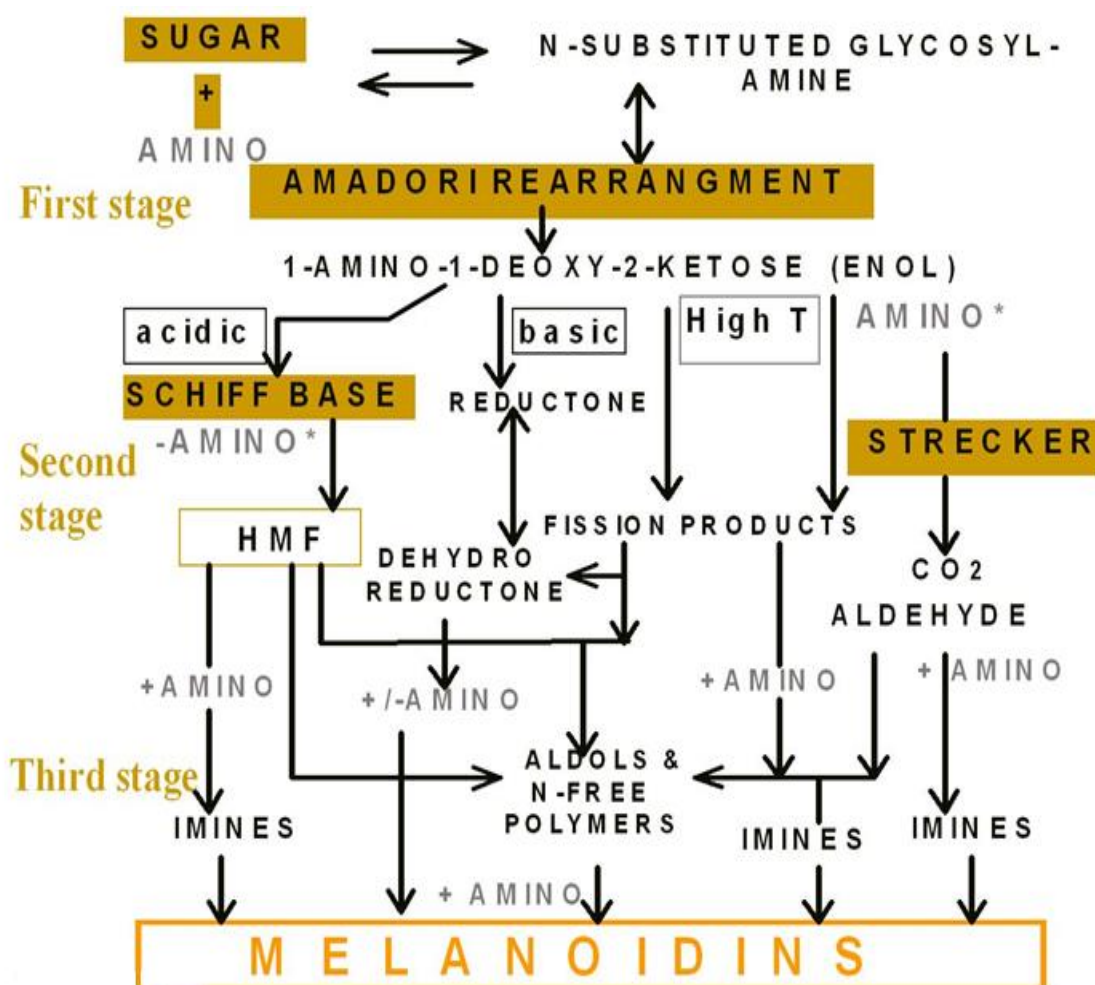


Figura 9 – Reazione di Maillard secondo lo schema di Hodge J.E. (1953).

E' fondamentale sottolineare come l'apporto di melanoidine alla birra finita, oltre che dalla maltatura, è dovuto anche alla successiva fase di bollitura del mosto (Fulgencio *et al.*, 2009).

Nel corso degli anni sono stati condotti studi riguardanti la natura delle molecole antiossidanti derivanti dal malto. Innanzitutto, lo studio condotto da Maillard & Berset (1995) ha permesso di dimostrare come il malto d'orzo presenti un potere antiossidante intrinseco (valutato come inibizione dell'ossidazione del metil – linoleato) superiore all'orzo tal quale certificando in questo modo l'effettiva funzionalità della maltatura.

Studi condotti da Ames (2000) e da Wijewickreme & Kitts (1998) hanno messo in evidenza, invece, la capacità delle melanoidine, e più in generale dei prodotti della reazione di Maillard, di poter svolgere il ruolo di “*radical scavengers*” (capacità di “spazzare” via i radicali liberi).

I lavori condotti da Tubaro (2009) e dal gruppo Zhao *et al.* (2010) hanno permesso di certificare meglio il ruolo svolto dai prodotti della Maillard: in questi studi, infatti, sono state monitorate le attività antiossidanti in diversi campioni di birra (Ale e Lager). I risultati hanno dimostrato che le ricette scure ed ambrate (caratterizzate da un uso maggiore dei malti scuri) presentano un'attività antiossidante superiore rispetto alle ricette chiare e come, nello specifico, le birre scure ne manifestino i valori più elevati.

Inoltre, il malto influenza l'attività antiossidante della birra grazie ai composti fenolici in esso presenti; nello specifico dai malti derivano circa il 70 – 80% dei polifenoli totali presenti nella birra finita (Knorr, 1978; De Keukeleire, 2000).

In particolar modo, quelli maggiormente identificati sono catechine ed acido ferulico (Maillard e Berset, 1995; Goupy *et al.*, 1999) anche se le prime tendono a diminuire man mano che procede la fase dell'essiccamento (Woffenden *et al.*, 2002). Monitorando, durante essiccamento e tostatura, le variazioni dell'attività antiossidante del malto (con metodo

dell'autossidazione del metil – linoleato) unitamente alle oscillazioni del contenuto totale degli acidi fenolici è stata dimostrata una relazione positiva, ma non lineare, tra l'attività antiossidante e la presenza di composti fenolici (Bonnely *et al.*, 2000).

1.4.2 GLI ANTIOSSIDANTI DEL LUPPOLO

Il contributo della materia prima luppolo sul potere antiossidante della birra è legato esclusivamente ai polifenoli in esso presenti; nello specifico, la loro concentrazione varia, nel luppolo, tra il 3 – 6% (p/p) sul peso secco (Tab. 4). Dal luppolo, inoltre, deriva il rimanente 20 – 30% dei polifenoli totali presenti nel prodotto finito (Knorr, 1978; De Keukeleire, 2000).

Questi metaboliti sono parte di una grande famiglia composta da circa 5000 molecole organiche presenti nel regno vegetale. La principale caratteristica che li accomuna, come dice il nome stesso, è legata alla presenza di molteplici gruppi fenolici (nel caso ne sia presente solo uno si parla di fenoli semplici) associati in strutture più o meno complesse.

La sintesi dei composti fenolici rientra, nelle piante, all'interno del metabolismo secondario ed avviene, soprattutto, grazie alla via biosintetica dell'acido scichimico (Fig. 10).

Grazie a questa via metabolica ed attraverso una serie di reazioni in sequenza vengono sintetizzati gli amminoacidi aromatici (fenilalanina, tirosina e triptofano) dai quali si andranno a costituire tutti i derivati dell'acido cinnamico (fenoli semplici e complessi). L'enzima più importante di questo complesso metabolismo è sicuramente la fenilalanin ammonio liasi (PAL) il quale è responsabile della deaminazione della fenilalanina in acido trans – cinnamico e ione ammonio (NH_4^+) (Torssell *et al.*, 1997).

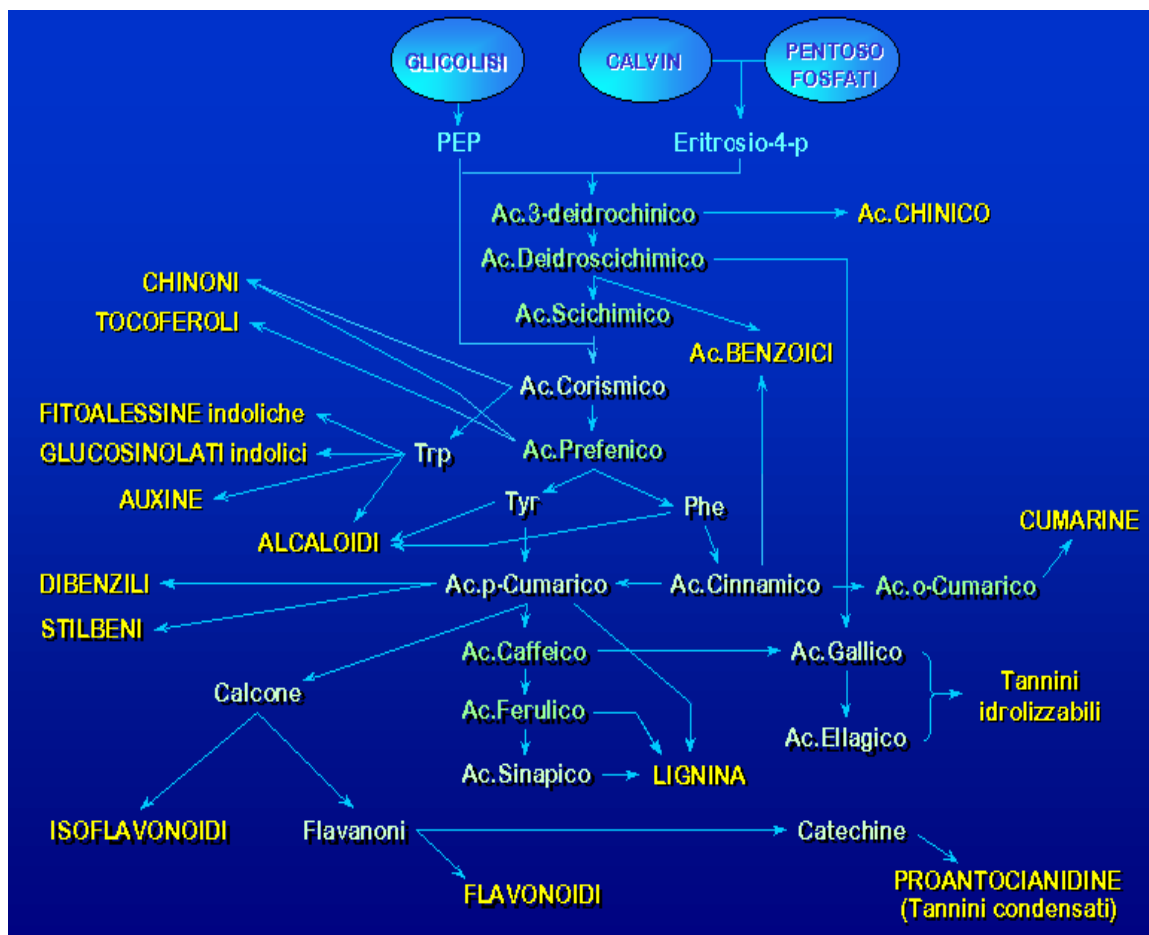


Figura 10 – Biosintesi dei polifenoli tramite la via dell'acido scichimico.

In generale, all'interno di questa famiglia di composti, possiamo individuare differenti classi:

- **Flavonoidi:** all'interno di questa classe possiamo trovare antociani, flavonoli, flavanoli e diidrofalconi. Queste sostanze fenoliche condividono uno scheletro comune C6 – C3 – C6 costituito da due anelli fenolici (anelli A e B) collegati tra loro da un anello piranico eterociclico (anello C). All'interno di ciascuna classe di flavonoidi possiamo trovare differenti composti a causa di modifiche a carico dei tre anelli dello scheletro carbonioso come idrossilazione, metilazione degli idrossili fenolici, glicosilazione, acilazione degli idrossili alcolici e reazioni di polimerizzazione soprattutto a carico dei flavanoli;

- **Fenoli “non flavonoidi”:** all’interno di questa classe troviamo invece acidi idrossibenzoici (derivati dell’acido benzoico), acidi idrossicinnamici (ad esempio acido p – cumarico, acido ferulico ed acido caffeico), fenoli volatili, stilbeni e vari composti come lignine e cumarine;
- **Tannini:** con il termine “tannini” si indicano una serie di composti strettamente legati alle classi fenoliche precedentemente elencate. Si distinguono due differenti tipologie di tannini: idrolizzabili e condensati. I primi, facili da idrolizzare e derivanti dal metabolismo degli acidi idrossibenzoici, si dividono in gallotannini (dalla cui idrolisi si ottengono acido gallico e glucosio) ed ellagitannini (da cui si ottengono, invece, acido gallico, glucosio ed acido ellagico) mentre i secondi, molto più resistenti alle reazioni di idrolisi, appartengono alla classe dei flavanoli; legati quindi al metabolismo dei flavonoidi sono noti anche come proantocianidine.

Studi in vitro hanno messo in evidenza come i polifenoli della birra, oltre ad una spiccata attività antiossidante, manifestino attività anticancerogena, antinfiammatoria, antivirale ed estrogenica (Tobe *et al.*, 1997; Milligan *et al.*, 2000; Gerhauser *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Gerhauser, 2005; Gorinstein *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2009).

Come nel caso del malto, anche nel luppolo sono stati condotti studi volti a determinare quali fossero le molecole fenoliche ad attività antiossidante maggiormente presenti.

In generale, i polifenoli individuati nel luppolo possono essere suddivisi in due macro categorie: monomerici e polimerici; tra i primi troviamo acidi idrossibenzoici (acido gallico), acidi idrossicinnamici (acido p – cumarico, acido ferulico, acido caffeico) e flavonoidi (xantumolo, catechina) mentre nei secondi distinguiamo proantocianidine e tannini idrolizzabili (Kammhuber *et al.*, 1998). Molti flavonoidi come ad esempio calconi e

flavanoni sono stati identificati tanto nel luppolo quanto nella birra (Stevens *et al.*, 1998, 1999); come i composti fenolici in generale, questi flavonoidi possono essere direttamente responsabili dell'attività antiossidante della birra (Vinson *et al.*, 2003). Ancora, studi in vitro hanno permesso di dimostrare come, nello specifico, i principali acidi fenolici siano implicati in molteplici processi benefici per la salute umana: l'acido gallico, ad esempio, ha manifestato attività apoptotica nei confronti delle cellule cancerogene; l'acido caffeico una spiccata attività antinfiammatoria con acido ferulico ed acido p – cumarico in grado di esplicitare una importantissima attività antiossidante (Ohno *et al.*, 1999; Zang *et al.*, 2000; Marimuthu *et al.*, 2007; Chao *et al.*, 2010).

Il lavoro condotto dal gruppo Zhao *et al.* (2010) è importante non solo per quanto concerne il monitoraggio delle attività antiossidanti in quanto, in tale studio, si è proceduto con il valutare, oltre alle singole attività antiossidanti, anche la componente fenolica totale unitamente al dosaggio dei principali composti fenolici nei campioni di birra appartenenti ai principali brand commercializzati in tutto il mondo.

Tra i molteplici composti fenolici che sono stati studiati ed individuati nel luppolo quello più abbondante a livello di materia prima risulta essere, tuttavia, lo xantumolo; quest'ultimo è, nello specifico, un flavonoide prenilato il quale ha mostrato un ampio spettro di funzioni benefiche per l'organismo umano come ad esempio: attività antiossidante, antinfiammatoria, antiangiogenica ed antiapoptotica (Magalhaes *et al.*, 2009).

Purtroppo, nei prodotti oggi in commercio la concentrazione finale di xantumolo è estremamente bassa risultando essere inferiore agli 0.1 mg/L (Wunderlich *et al.*, 2005; Magalhaes *et al.*, 2011). Questa netta diminuzione dello xantumolo nella birra finita, rispetto all'abbondanza riscontrata nel luppolo, è dovuta essenzialmente al processo di isomerizzazione che si

realizza a carico della molecola durante la fase di bollitura del mosto nella quale lo xantumolo viene convertito in isoxantumolo il quale manifesta attività antimicrobica ma nessuna attività antiossidante (Mizobuchi & Sato, 1984; Miranda *et al.*, 2000; Gerhauser *et al.*, 2002; Steven & Page, 2004; Wunderlich *et al.*, 2005; Karabin *et al.*, 2013).

Altri studi hanno messo in evidenza come, durante il processo tecnologico, la quantità di xantumolo tende a diminuire non solo durante la bollitura, ma anche durante la fermentazione, filtrazione e pastorizzazione (Magalhaes *et al.*, 2008, 2010; Karabin *et al.*, 2013).

In conclusione possiamo affermare come, in generale, il discorso fatto specificamente per lo xantumolo valga anche per i tutti polifenoli della birra (derivanti tanto dal malto quanto dal luppolo) in quanto, nonostante siano presenti in quantità elevate a livello delle materie prime impiegate, durante le differenti fasi del processo tecnologico tenderanno progressivamente a diminuire la loro concentrazione nel mosto; a tal proposito basti pensare ai fenomeni di precipitazione dei complessi tanno – proteici che si verificano durante la bollitura e durante la fermentazione del mosto. Solo una minima quota dei polifenoli della miscela di partenza sarà presente, dunque, nella birra imbottigliata.

Infine vengono mostrate le strutture chimiche delle principali molecole fenoliche studiate nel luppolo e, più in generale, nella birra (Fig. 11 – 16

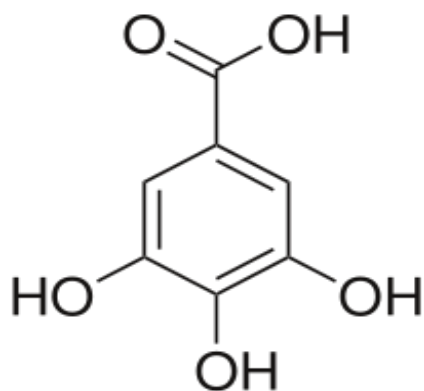


Figura 11 – Acido Gallico

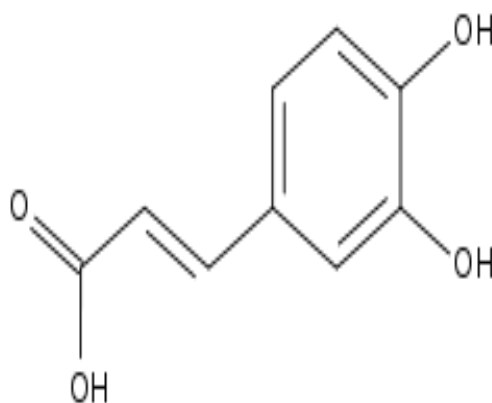


Figura 12 – Acido Caffeico

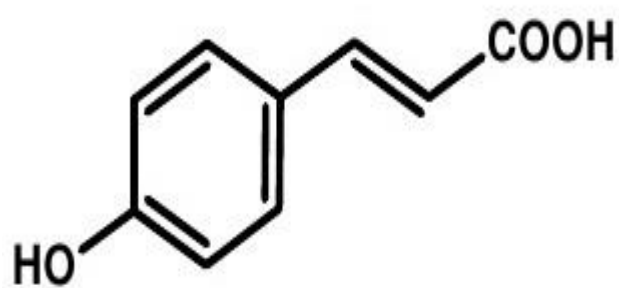


Figura 13 – Acido p – Cumarico

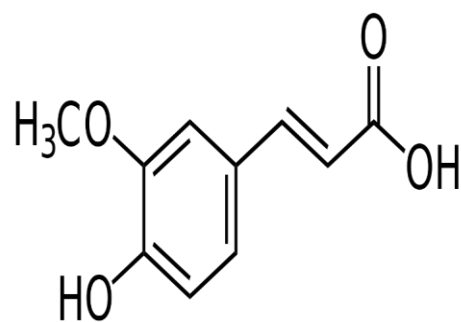


Figura 14 – Acido Ferulico

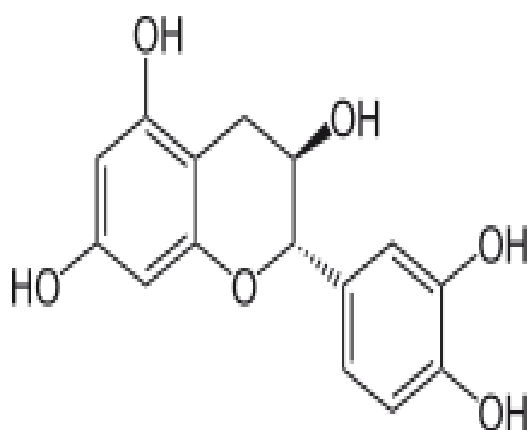


Figura 15 – Catechina

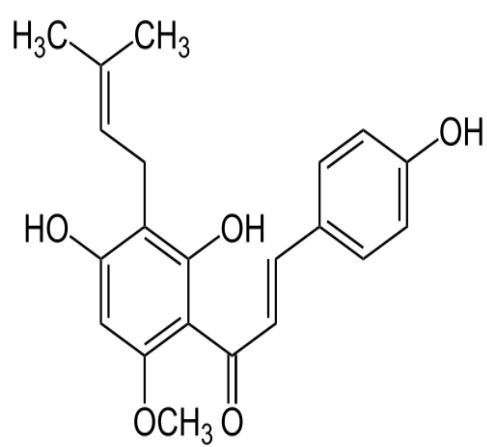


Figura 16 - Xantumolo

1.5 CELIACHIA

La Malattia Celiaca è un'intolleranza permanente del piccolo intestino nei confronti del glutine, un complesso costituito da alcune proteine localizzate nella cariossidi di cereali come orzo, frumento, avena e segale. In fase di attiva malattia, il glutine causa lesioni a livello della mucosa dell'intestino tenue, con conseguente alterazione della funzione di assorbimento.

La celiachia si manifesta con atrofia dei villi intestinali associata ad iperplasie delle cripte del Lieberkühn, con un quadro che tende a recedere dopo l'eliminazione dalla dieta dell'agente causale. Attualmente è appurato il fatto che l'anomala sensibilità nei confronti del glutine è conferita da una predisposizione associata sia a geni di tipo HLA (Human Leukocyte Antigen) sia a geni non appartenenti a tale sistema. Inoltre nei soggetti geneticamente predisposti, il consumo alimentare di glutine innesca una risposta immunitaria sia di tipo umorale che cellulare – mediata, la quale determina un rimodellamento mucosale responsabile del quadro sintomatologico tipico della malattia (Fasano *et al.*, 2001).

1.5.1 NORMATIVA VIGENTE SUL GLUTINE

Da un punto di vista normativo il glutine è definito come la frazione proteica che troviamo in cereali quali orzo, frumento, segale, avena ed in tutte le varietà da questi derivanti, per i quali alcune persone mostrano intolleranza (Codex Alimentarius Commission, 2009).

La prima normativa in tema di composizione ed etichettatura dei prodotti alimentari destinati alle persone intolleranti al glutine è rappresentata dal Regolamento (CE) 41/2009 entrato in vigore il 1° Gennaio 2012 in risposta a quanto stabilito dalla commissione del Codex Alimentarius.

Tale regolamento stabilisce principalmente che, a partire da tale data:

- Il contenuto di glutine dei prodotti alimentari destinati alle persone intolleranti al glutine, consistenti di ingredienti ricavati da frumento,

segale, orzo, avena o da loro varietà incrociate, specialmente lavorati per ridurre il contenuto di glutine, o contenenti uno o più di tali ingredienti, non deve superare 100 mg/kg (100 ppm) nei prodotti alimentari quali venduti al consumatore finale (Art. 3, Par I);

- L'etichettatura, la pubblicità e la presentazione dei prodotti di cui al paragrafo I devono riportare la menzione “Very Low Gluten” (ed analoghe traduzioni). È ammessa la menzione “Gluten – Free” (ed analoghe traduzioni) se il contenuto di glutine non supera 20 mg/kg (20 ppm) nei prodotti alimentari quali venduti al consumatore finale (Art. 3, Par II);
- Le menzioni “Very Low Gluten” o “Gluten – Free” devono essere indicate accanto alla denominazione di vendita del prodotto (Art. 3, Par VI).

Tale normativa è stata abrogata e sostituita da un nuovo Regolamento: l'1169/2011, relativo al sistema di etichettatura dei prodotti alimentari, entrato in vigore a partire dal 13 Dicembre 2011.

Il Regolamento (UE) 1169/2011 ha sostanzialmente confermato le regole ed il sistema di gestione dell'informazione sul glutine presente negli alimenti; una delle novità rilevanti, rispetto alla normativa precedente, riguarda l'obbligo di utilizzare un carattere ben distinguibile (per dimensioni, stile e colore di fondo) per riportare il nome degli allergeni eventualmente presenti rispetto agli altri ingredienti (Art. 21, Comma 1 – b).

1.5.2 BIRRA E GLUTINE

Da un punto di vista scientifico, il termine “glutine” viene utilizzato per descrivere le proteine di riserva di cereali quali orzo, frumento, segale ed avena le quali, in riferimento alla loro tossicità esplicitata nei confronti dei pazienti celiaci, prendono il nome rispettivamente di ordeine, gliadine,

secaline ed avenine; queste proteine vengono classificate all'interno del gruppo delle prolammine (Hager *et al.*, 2014).

La struttura del glutine, tuttavia, coinvolge ulteriori classi proteiche: le gluteline, le albumine e le globuline; nello specifico, prolammine e gluteline costituiscono più dell'80% dell'intera frazione glutinica.

La formazione del glutine avviene nel momento in cui, grazie alla presenza di acqua ed energia meccanica, si creano le condizioni ideali per l'unione delle frazioni proteiche coinvolte, se presenti (Fig. 17).

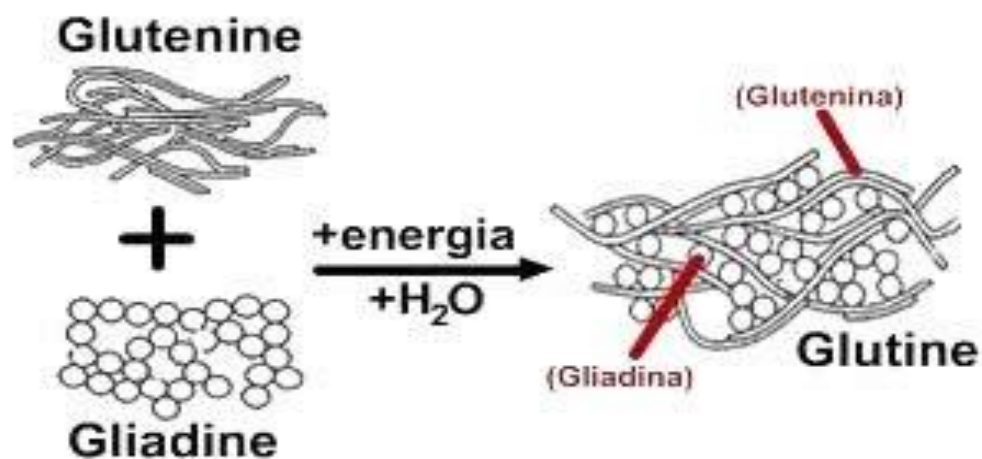


Figura 17 – Formazione del glutine.

La maggior parte delle birre ottenute da malti d'orzo e di frumento sono generalmente considerate inadatte per chi soffre di celiachia; questo nonostante il fatto che soltanto una piccola percentuale del glutine inizialmente presente nel malto rimane nella birra finita. L'abbattimento della quantità di glutine presente inizialmente nel malto avviene principalmente durante le fasi di ammostamento (soltanto una minima parte delle proteine presenti vengono idrolizzate), risciacquo delle trebbie (le proteine non idrolizzate rimangono intrappolate all'interno delle trebbie) e fermentazione (il decremento del pH determina la precipitazione di ulteriori

strutture proteiche ed il loro assorbimento sulla superficie del lievito); la perdita di glutine durante la bollitura viene invece considerata trascurabile (abbiamo la precipitazione dei complessi tanno – proteici costituiti, nella maggior parte dei casi, da strutture proteiche non glutiniche) (Hager *et al.*, 2014).

Guerdrum & Bamforth (2012) hanno effettuato uno studio in tal proposito andando a monitorare i livelli di glutine durante tutta la durata del processo tecnologico ottenendo i risultati di seguito mostrati in tabella (Tab. 6).

	Glutine (ppm)	Glutine (%)
Malto	13664	100
Mosto	5934	43.4
Birra finita	262	1.9

Tabella 6 – Livelli di glutine registrati durante il processo produttivo della birra. Fonte: Guerdrum & Bamforth, 2012.

Come possiamo vedere dalla Tab. 6, i livelli di glutine tendono ad abbattersi in maniera drastica durante la produzione della birra; tuttavia il livello registrato nel prodotto finito non è compatibile con i valori imposti dalla normativa vigente (< 100 ppm). Questo è il motivo per cui, in generale, le birre prodotte con cereali quali orzo, frumento, avena e segale non sono compatibili con la dieta celiaca.

Oggi, il metodo maggiormente utilizzato per l'ottenimento di un prodotto privo di glutine è quello basato sulla produzione di birra mediante l'utilizzo di succedanei dell'orzo privi di glutine e/o pseudocereali (sorgo, miglio, mais, riso, grano saraceno, quinoa ed amaranto) (Arendt & Zannini, 2013). Questi prodotti possono essere tranquillamente consumati dai celiaci in quanto caratterizzati dalla totale assenza di glutine; tuttavia, in termini

sensoriali, non potranno essere assolutamente paragonati alle classiche birre artigianali.

Questo è il motivo per il quale negli ultimi anni sono stati condotti un numero crescente di studi volti a comprendere quali possano essere le strategie da adottare per poter produrre un prodotto birra a basso contenuto o addirittura privo di glutine partendo, tuttavia, dai classici malti utilizzati nel processo brassicolo; l'attenzione dei gruppi di ricerca si è concentrata soprattutto sull'utilizzo di coadiuvanti tecnologici ed enzimi.

Uno studio condotto dal gruppo di ricerca Dostalek *et al.* (2006) è riuscito a dimostrare che, utilizzando il PVPP (Polivinilpolipirrolidone), un gel di silice generalmente impiegato nel settore enologico, la quantità di glutine nella birra finita era quantificabile nella percentuale dello 0.11% rispetto al livello iniziale. Ancora, Van Landschoot (2011) ha riportato che, aggiungendo tannini al mosto si riesce a stimolare la precipitazione delle prolamine dell'orzo stimolando la formazione di complessi ordeine – polifenoli, che in condizioni normali tenderebbero a non formarsi.

Alcuni studi sono stati inoltre condotti sulla possibilità di abbattere il glutine mediante un enzima, la prolin – endopeptidasi, purificato dall' *Aspergillus niger* i quali hanno dato risultati molto incoraggianti (Van Landschoot, 2011; Guerdum & Bamforth, 2012).

In conclusione, è importante sottolineare come la scelta delle materie prime, soprattutto la tipologia di malto d'orzo, sia fondamentale per poter aumentare le probabilità di raggiungere tale obiettivo. A tal proposito, il gruppo di ricerca Dostalek *et al.* (2006) ha analizzato anche la quantità di glutine in due differenti tipologie di malto d'orzo: il “Pilsner” ed il “Carafa” ottenendo come valori 19000 ppm nel primo e 45000 ppm nel secondo. E' facilmente intuibile che sarà, teoricamente, molto più agevole raggiungere la quota di 100 ppm utilizzando, in questo caso, il malto Pilsner rispetto al malto Carafa.

2. OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI

Negli ultimi dieci anni in Italia si è assistito ad una esplosione del mercato della birra artigianale con realtà produttive comparse su tutto il territorio nazionale. Scarsi sono invece gli studi scientifici condotti su questo prodotto, tanto semplice quanto complesso; i lavori condotti in Italia sulla birra risultano essere estremamente rari mentre sono praticamente assenti in relazione al settore artigianale.

Ad oggi quindi, molti aspetti del prodotto “birra artigianale” sono poco conosciuti; con questo lavoro di tesi si è cercato di far luce su determinate caratteristiche di tale prodotto, in modo che si possa cominciare a comprendere se sia possibile considerare, o meno, il prodotto birra artigianale un vero e proprio alimento nutraceutico – funzionale analogamente a quanto già avviene, ad esempio, con il vino.

Il seguente lavoro di tesi magistrale si propone fondamentalmente tre obiettivi: in primo luogo la produzione di tre ricette brassicole differenti, sfruttando l'impianto geotermico del birrificio Vapori di Birra ottenendo così dei prodotti sostenibili nel pieno rispetto dell'ambiente.

In secondo luogo si è proceduto con il dosaggio delle molecole ad attività antiossidante presenti nei campioni in esame, valutando come queste varino in funzione dello stile e della strategia tecnologica adottata e paragonando, allo stesso tempo, i risultati ottenuti con dati sperimentali relativi a studi condotti su birre industriali e sul vino, in particolar modo quello bianco.

Infine, sono stati effettuati dei test volti a determinare l'effettiva quantità di glutine presente nelle tre ricette valutandone, come nel caso delle molecole ad attività antiossidante, il grado di variazione in funzione dei differenti approcci tecnologici impiegati, nell'ottica futura di comprensione dei metodi più idonei da adottare per l'ottenimento di un prodotto a basso contenuto o privo di glutine partendo tuttavia dalle materie prime classiche.

3. MATERIALI E METODI

All'interno della seguente sezione vengono illustrate e descritte le metodologie utilizzate, durante il periodo di tesi, per la produzione in birrificio delle tre ricette brassicole e per l'analisi in laboratorio dei differenti campioni di birra.

3.1 PRODUZIONE BRASSICOLA

3.1.1 L'IMPIANTO GEOTERMICO

Il complesso geotermico EGP (Enel Green Power) di Larderello è famoso in tutto il mondo per i numerosi impianti ad alta sostenibilità in grado di impiegare il vapore geotermico, proveniente dalle sorgenti d'acqua del sottosuolo, per la produzione di energia elettrica e termica; è in questa zona che ha sede l'impianto del birrificio “Vapori di Birra” il quale, come già anticipato, è l'unico in Italia a sfruttare il vapore geotermico come fonte primaria di energia per alimentare il processo brassicolo (Fig. 18).



Figura 18 – Impianto geotermico del birrificio “Vapori di Birra” presso Sasso Pisano (PI) in piena produzione.

Nello specifico, il processo di produzione del birrificio sfrutta, attraverso gli impianti EGP, il vapore generato da un pozzo geotermico (un vero e proprio geyser artificiale) profondo oltre 12000 metri scavato nel 1979.

L'energia geotermica non viene utilizzata soltanto per la produzione, ma anche nei processi di sanitizzazione. Al momento soltanto i meccanismi di refrigerazione non prevedono lo sfruttamento del vapore in quanto basati su sistemi estremamente costosi.

In ogni caso, l'utilizzo della geotermia permette da un lato, un abbattimento dei costi in termini di energia elettrica quantificabile in una percentuale di circa il 20% e dall'altro, un miglioramento del processo tecnologico con un raggiungimento delle temperature di processo in tempi molto più rapidi.

3.1.2 CARATTERISTICHE BIRRE PRODOTTE

Durante il periodo di tesi sono state prodotte tre differenti birre:

- **“Accademica” (stile Belgian Ale):** contenente malto d'orzo ed una percentuale di malti scuri del 7.5% responsabili del colore ambrato – marrone; poco luppolata; 5% abv (Fig.19);



Figura 19 – Bottiglia da 50 cl di Accademica (stile Belgian Ale).

- **“Ipagea” (stile White IPA):** contenente malto d’orzo, frumento ed avena con una robusta luppolatura a fine fermentazione (Dry Hopping); 6.5% abv (Fig. 20);



Figura 20 – Bottiglia da 50 cl di Ipagea (stile White IPA).

- **“Lokomotiv” (stile Blanche):** contenente malto d’orzo, frumento, avena ed aromatizzata con bucce d’arancia; poco luppolata; 5% abv (Fig. 21).



Figura 21 – Bottiglia da 50 cl di Lokomotiv (stile Blanche).

3.2 PRETRATTAMENTO CAMPIONI

Le analisi di laboratorio sono state effettuate presso il Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Agro – Ambientali per quanto concerne la parte dedicata alla valutazione delle proprietà antiossidanti; i saggi sul glutine, invece, sono stati commissionati al Centro di Eccellenza per la Ricerca sulla birra (CERB) di Perugia.

Da un punto di vista chimico la birra è una soluzione idro – alcolica contenente principalmente acqua, etanolo ed anidride carbonica. Data la natura della matrice in esame si è deciso, quindi, di pretrattare opportunamente i campioni di birra prima di procedere ai differenti saggi riguardanti le proprietà antiossidanti, mentre le analisi concernenti il glutine sono state condotte sulla matrice birra seguendo il protocollo fornito dall'azienda produttrice del kit d'analisi validato per tale saggio.

I pretrattamenti condotti hanno riguardato l'analisi dello spettro di assorbimento dei differenti campioni di birra e la loro liofilizzazione.

3.2.1 ANALISI DELLO SPETTRO DI ASSORBIMENTO

L'analisi dello spettro di assorbimento dei nostri campioni di birra (Fig. 22 – 24) si è reso necessario in quanto bisogna valutare eventuali interferenze nelle analisi spettrofotometriche dovute all'assorbimento fisiologico del campione tal quale.

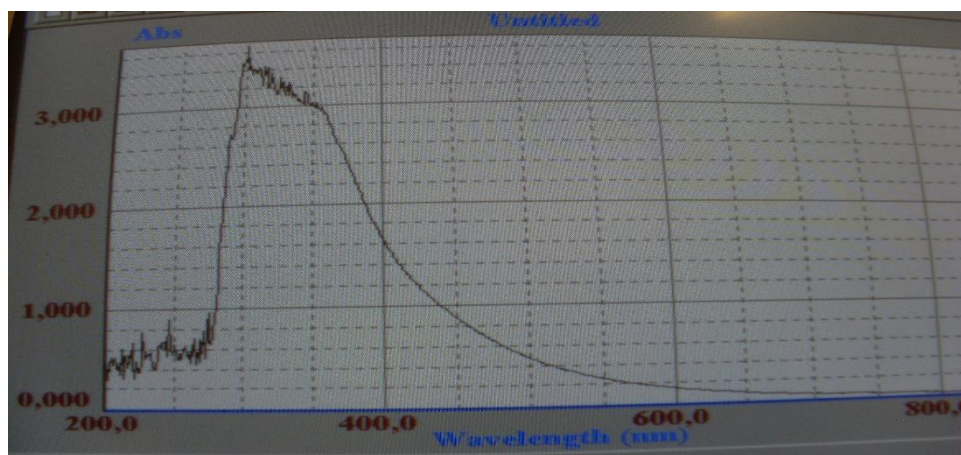


Figura 22 – Spettro di assorbimento del campione di Accademica (stile Belgian Ale).

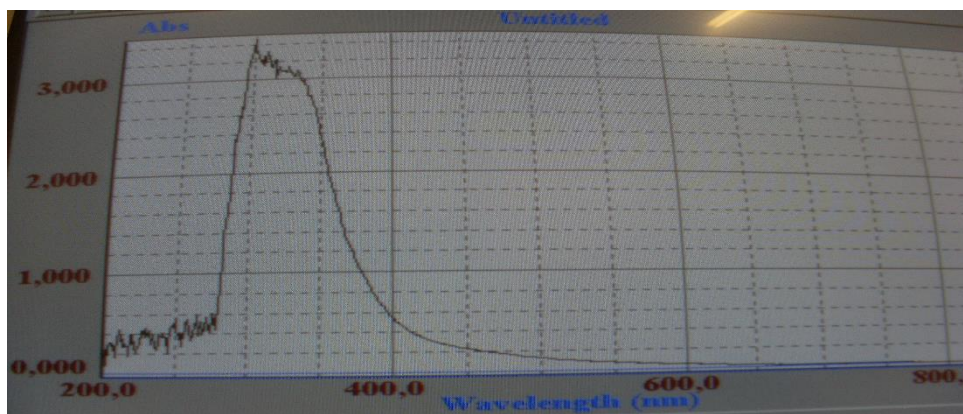


Figura 23 – Spettro di assorbimento del campione di Ipagea (stile White IPA).

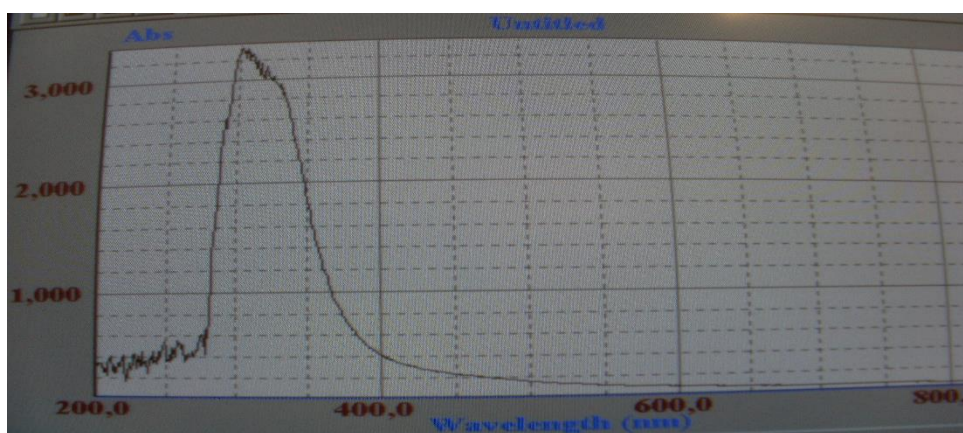


Figura 24 – Spettro di assorbimento del campione di Lokomotiv” (stile Blanche).

Dagli spettri di assorbimento dei differenti campioni di birra si è appurato come non sussistano problemi per quanto riguarda l’analisi dei fenoli totali (lettura a 750 nm) e dell’attività antiossidante (lettura a 734 nm) in quanto l’assorbimento fisiologico è praticamente nullo a tali lunghezze d’onda, mentre per il dosaggio dei flavonoidi totali (lettura a 510 nm) si è riscontrato un discreto assorbimento in tutti i campioni e per questo motivo, in sede di analisi, è stato necessario tenerne conto.

3.2.2 LIOFILIZZAZIONE

I campioni di birra precongelati (Fig. 25) sono stati caricati all’interno del liofilizzatore e lasciati overnight; una volta terminato il trattamento risulteranno completamente disidratati e degassati.

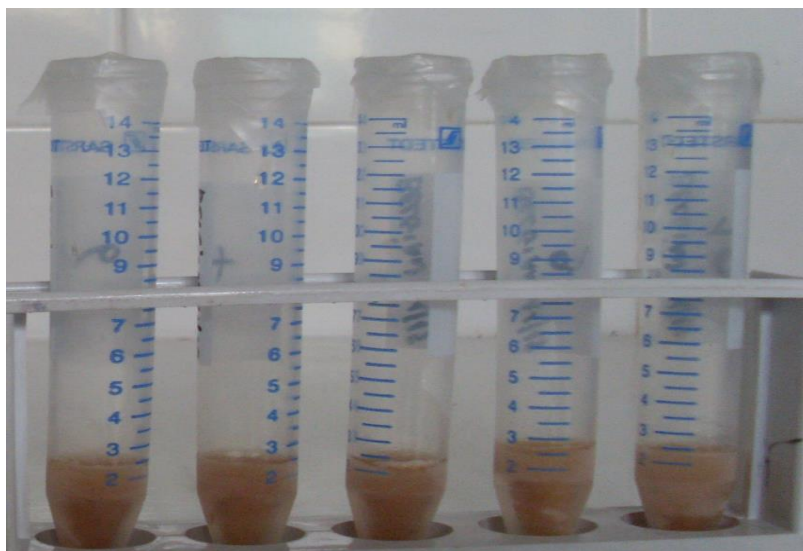


Figura 25 – Campioni di birra Accademica precongelati pronti per essere caricati nel liofilizzatore. L'applicazione del parafilm (sul quale vengono praticati alcuni fori) permette l'eliminazione dell'anidride carbonica e del solvente sublimato.

A questo punto i campioni di birra liofilizzati (Fig. 26) vengono lasciati in congelatore ad una temperatura di -20°C fino al momento del loro utilizzo dove verranno risospesi in acqua milliQ ripristinando così le condizioni iniziali in termini di volume e concentrazione del campione che, tuttavia, risulterà perfettamente degassato.

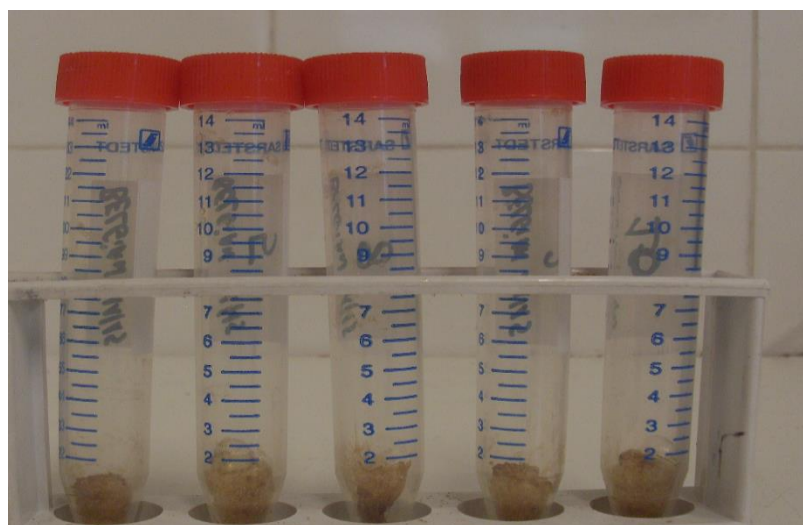


Figura 26 – Campioni di birra Accademica liofilizzati.

3.3 DOSAGGIO DELLA COMPONENTE FENOLICA TOTALE

Per il dosaggio dei fenoli totali si è proceduto utilizzando il metodo di Folin – Ciocalteau.

Il principio di tale saggio si basa sull'ossidazione dei composti fenolici causata dal reattivo di Folin – Ciocalteau, costituito da una miscela di acido fosfotungstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) ed acido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Per reazione con i fenoli, questi acidi si riducono, rispettivamente, ad ossidi di tungsteno (WO_3) ed ossidi di molibdeno (Mo_8O_{23}) determinando un viraggio di colore della miscela di reazione dal giallo al blu con un picco di assorbimento a 750 nm.

Per accelerare la reazione, favorendone così la cinetica, si è aggiunto carbonato di sodio al 20% (Na_2CO_3) in modo tale da contrastare anche l'acidità del campione dovuta alla presenza dei fenoli stessi.

Il campione di partenza è stato diluito opportunamente (1:1; 1:2; 1:4; 1:8) (Fig. 27) e si è proceduto testando in triplo ciascuna diluizione, così da ridurre al minimo gli errori, contro un bianco di riferimento.

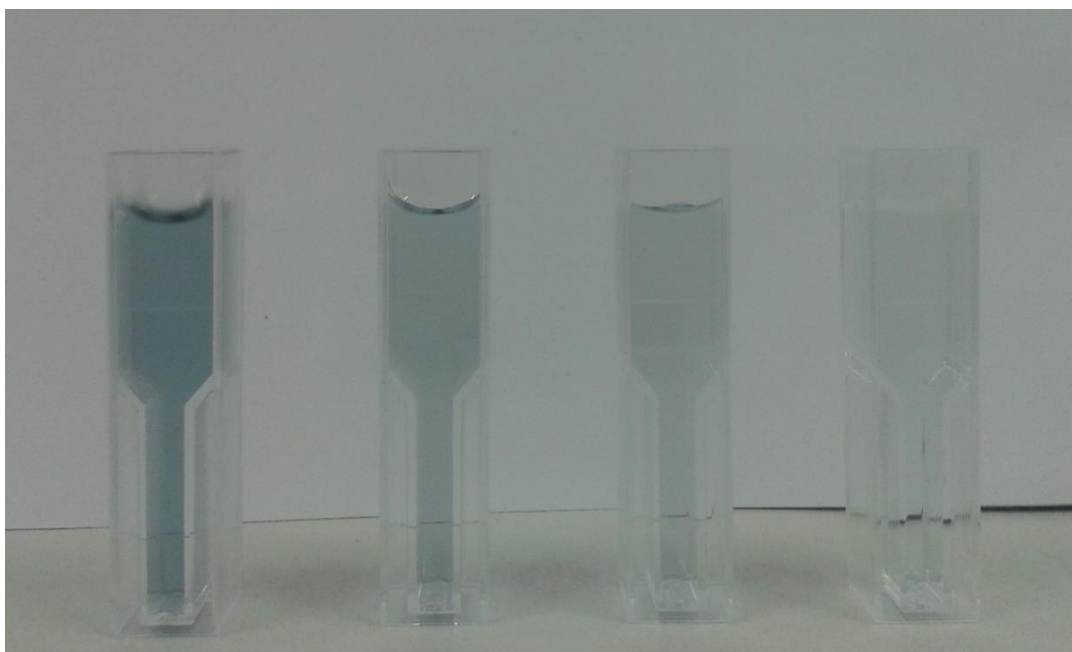


Figura 27 – Diluzioni del campione di birra per il saggio di Folin – Ciocalteau.

La miscela di reazione è stata preparata all'interno di cuvette da spettrofotometria in polistirene seguendo il seguente protocollo:

- Aggiunta di 25 µl di campione diluito (acqua milliQ per la cuvetta del bianco);
- Aggiunta di 1375 µl di reattivo di Folin – Ciocalteau;
- Miscele di reazione lasciate riposare per 8 minuti dopo opportuna agitazione;
- Aggiunta di 500 µl di carbonato di sodio (Na_2CO_3);
- Aggiunta di 600 µl di acqua milliQ;
- Agitazione della miscela di reazione che viene lasciata riposare al buio per 30 minuti;
- Lettura allo spettrofotometro a 750 nm.

I risultati vengono infine espressi come equivalenti di acido gallico (mg/L) e per questo motivo si è utilizzata, in fase di quantificazione, una retta di taratura ottenuta riportando in ascissa concentrazioni note di acido gallico (ppm), opportunamente diluito, ed in ordinata i relativi valori di assorbanza (Fig. 28). Gli equivalenti di acido gallico vengono quantificati applicando la seguente formula:

$$\text{Eq. Acido Gallico (mg/L)} = [(\text{Abs} / 0.0011) * \text{fattore diluizione}]$$

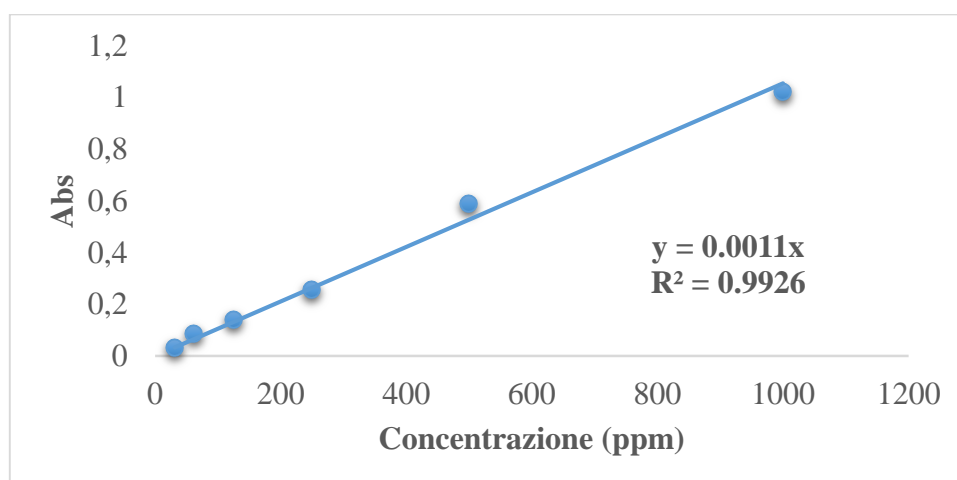


Figura 28 – Retta di taratura dell'acido gallico utilizzata per la quantificazione della componente fenolica totale

3.4 DOSAGGIO DEI FLAVONOIDI TOTALI

Il saggio utilizzato sfrutta la capacità che i flavonoidi hanno di poter chelare l'alluminio determinando così un viraggio di colore della miscela di reazione (tendente all'arancione) al quale si accompagna un cambiamento del picco di assorbimento con un massimo registrato a 510 nm.

Anche in questo caso il campione di partenza è stato diluito (1:1; 1:2; 1:4) (Fig. 29) e testato in triplo contro un bianco di riferimento.

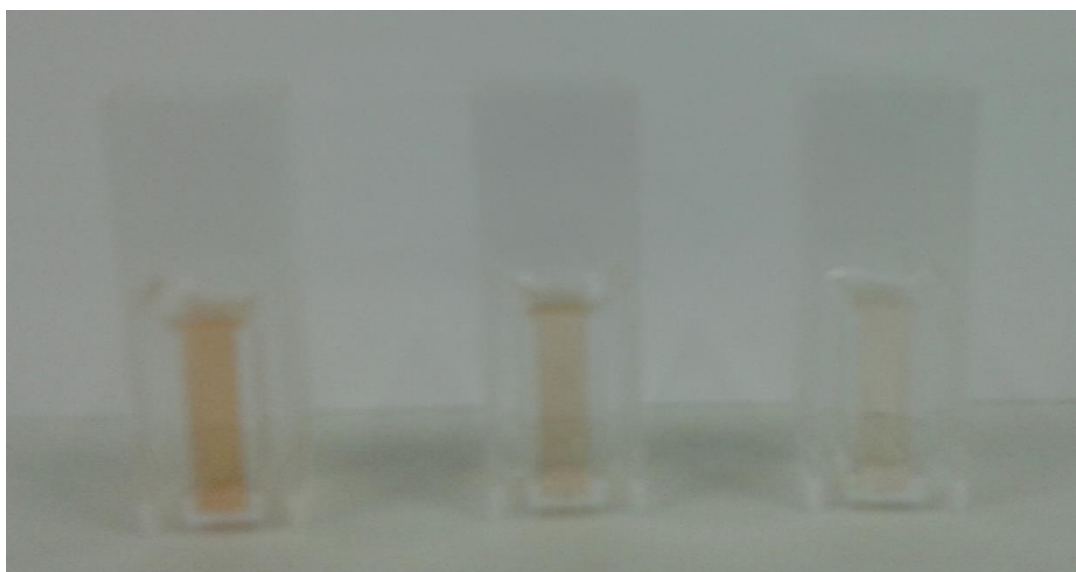


Figura 29 – Diluizioni del campione di birra per il saggio dei flavonoidi.

La miscela di reazione, preparata all'interno di cuvette in polistirene da spettrofotometria, è stata realizzata seguendo il seguente protocollo:

- Aggiunta di 100 µl di campione diluito (acqua milliQ per il bianco);
- Aggiunta di 60 µl di nitrito di sodio (NaNO_2);
- Miscela di reazione lasciata riposare 5 minuti dopo opportuna agitazione;
- Aggiunto di 40 µl di cloruro d'alluminio (AlCl_3);
- Miscela di reazione lasciata riposare per altri 5 minuti dopo nuova agitazione;
- Aggiunta di 400 µl di idrossido di sodio (NaOH);
- Aggiunta di 200 µl di acqua milli Q;

- Nuova agitazione della miscela finale di reazione con lettura immediata allo spettrofotometro a 510 nm.

I risultati vengono espressi come equivalenti di catechina (mg/L) e per questo motivo si è utilizzata una retta di taratura ottenuta riportando in ascissa concentrazioni note di catechina (ppm), opportunamente diluita, ed in ordinata i relativi valori di assorbanza (Fig. 30).

Dal momento che, come già anticipato, i campioni di birra hanno manifestato un discreto assorbimento fisiologico intorno ai 510 nm si è proceduto, in sede di analisi, trattando i campioni in esame in due modi differenti: nel primo caso si è preparata una miscela di reazione seguendo il protocollo del saggio mentre nel secondo si è sostituito AlCl_3 con acqua milliQ.

In questo modo l'assorbimento effettivo, dovuto ai soli flavonoidi, scaturisce dalla differenza dell'assorbanza registrata in presenza di AlCl_3 (calcolata naturalmente al netto del bianco) e quella registrata in presenza di acqua milliQ; sul risultato di tale differenza si è proceduto con la quantificazione sfruttando la retta di taratura della catechina.

Gli equivalenti di catechina vengono quantificati applicando la seguente formula:

$$\text{Eq. Catechina (mg/L)} = [(\text{Abs} / 0.0031) * \text{fattore diluizione}]$$

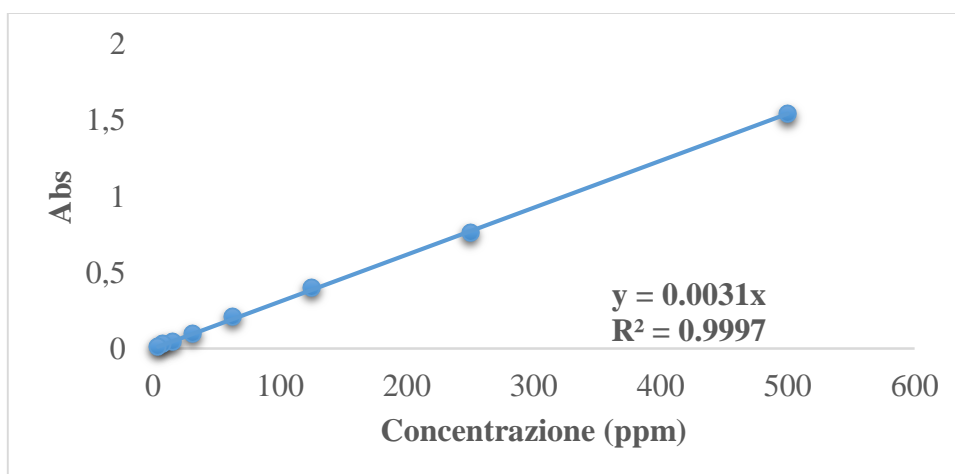


Figura 30 – Retta di taratura della catechina utilizzata per la quantificazione dei flavonoidi totali.

3.5 DOSAGGIO DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

L'attività antiossidante espressa dai nostri campioni di birra è stata valutata mediante il metodo dell'ABTS radicalico, messo a punto da Re *et al.* (1999). Tale metodo è basato sull'utilizzo del cromogeno 2,2' – azinobis (3 – etilbenzotiazolin – 6 – sulfonico) ($C_{18}H_{18}N_4O_6S_4$) in grado di produrre, nella forma radicalica, un assorbimento tipico a 734 nm.

Il saggio in questione utilizza una misura di tipo spettrofotometrico per determinare l'attività antiossidante di un campione generico; nello specifico lo spettrofotometro misura l'assorbanza di una soluzione contenente il radicale $ABTS^{\bullet+}$, generato per reazione del cromogeno ABTS 2,2' – azinobis (3 – etilbenzotiazolin – 6 – sulfonico) con un catalizzatore ossidante secondo la seguente reazione:



L'ABTS è una sostanza incolore, che nella forma radicalica si colora assorbendo a lunghezze d'onda caratteristiche nel range del visibile. L'aggiunta alla soluzione di ABTS radicalico di molecole ad attività antiossidante, in grado di reagire tramite cessione sia di idrogeno che di un elettrone, determina la riduzione del radicale alla forma incolore, con conseguente decolorazione della miscela di reazione.



Tale decolorazione, proporzionale alla quantità di antiossidante presente e quindi all'attività antiossidante realizzatasi, viene misurata come diminuzione dell'assorbanza entro un certo intervallo di tempo ad una specifica lunghezza d'onda (734 nm).

In virtù di ciò, l'attività antiossidante viene espressa come percentuale di decremento dell'assorbanza, detta anche “percentuale di inibizione” calcolata secondo l'equazione:

$$Abs (\%) = (1 - AbsC / AbsB) * 100$$

dove:

- **AbsC:** assorbanza del catione radicalico dopo l'aggiunta degli antiossidanti presenti nel campione in esame;
- **AbsB:** assorbanza del “bianco”, cioè del catione radicalico dopo l'aggiunta della sola acqua milli Q.

Per la realizzazione del saggio dell'ABTS radicalico si è seguito il seguente protocollo:

- Preparazione della soluzione di ABTS^{•+} ottenuta aggiungendo a 5 ml di soluzione stock ABTS 7 mM, 88 µl di solfato di potassio (K₂SO₄) (in questo modo la concentrazione finale di K₂SO₄ sarà di 2.45 mM) grazie al quale si formeranno le strutture radicaliche. Questa soluzione viene preparata circa 12 – 16 ore prima del saggio e mantenuta al buio a temperatura ambiente; rimane inoltre stabile per massimo due giorni.

Allo scopo di ottenere una concentrazione di ABTS radicalico nota, la soluzione viene diluita, al momento dell'analisi, con metanolo all'80% così da raggiungere un valore di assorbanza compreso tra 0,680 – 0,720 a 734 nm.

- Il campione in esame è stato diluito seguendo i rapporti seriali 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256 (Fig. 31); ciascuna diluizione, anche in questo caso, è stata testata in triplo.

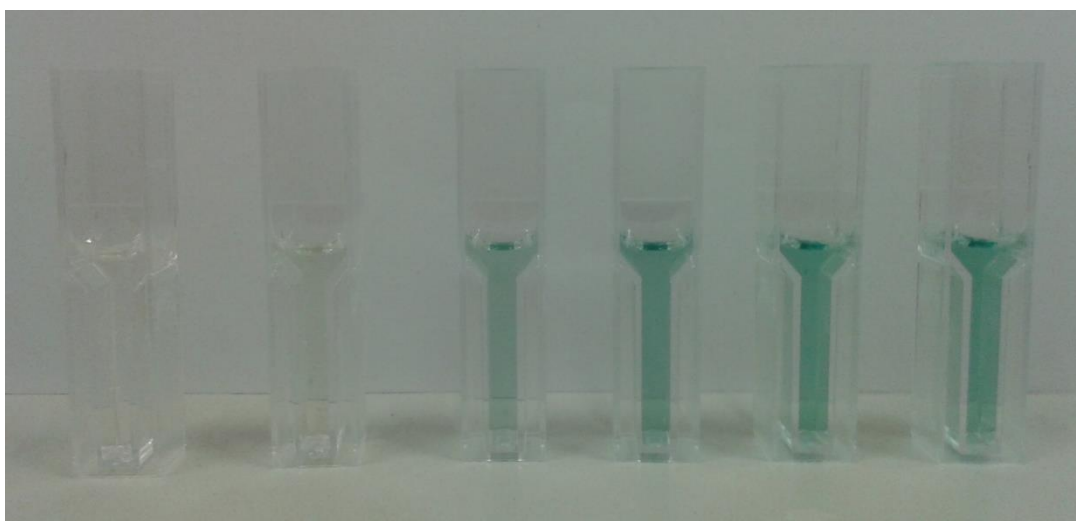


Figura 31 – Diluizioni del campione di birra per il saggio dell'attività antiossidante.

- Aggiunta in cuvetta di polistirene di 100 µl di campione (acqua milli Q per il bianco);
- Aggiunta di 1 ml di ABTS ^{•+};
- Lettura a 734 nm dopo 4 minuti.

Una volta registrati i valori di assorbanza si procede con il calcolo delle percentuali di inibizione, ritenute accettabili solo se comprese nel range 80 – 20%.

L'attività antiossidante viene espressa come TEAC (mmol/L) (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) e per questo motivo si è utilizzata una retta di taratura ottenuta calcolando per concentrazioni note di molecola antiossidante, opportunamente diluita, (Trolox, in ascissa), le relative percentuali di inibizione (in ordinata) (Fig. 32).

Gli equivalenti di Trolox vengono quantificati applicando la seguente formula:

$$\text{Eq. Trolox (mmol /L)} = [(\% \text{ inibizione} / 0.4654) * \text{fattore di diluizione}] / 1000$$

Si è deciso di esprimere la TEAC in mmol/L per confrontare meglio i dati ottenuti con quelli riportati in bibliografia.

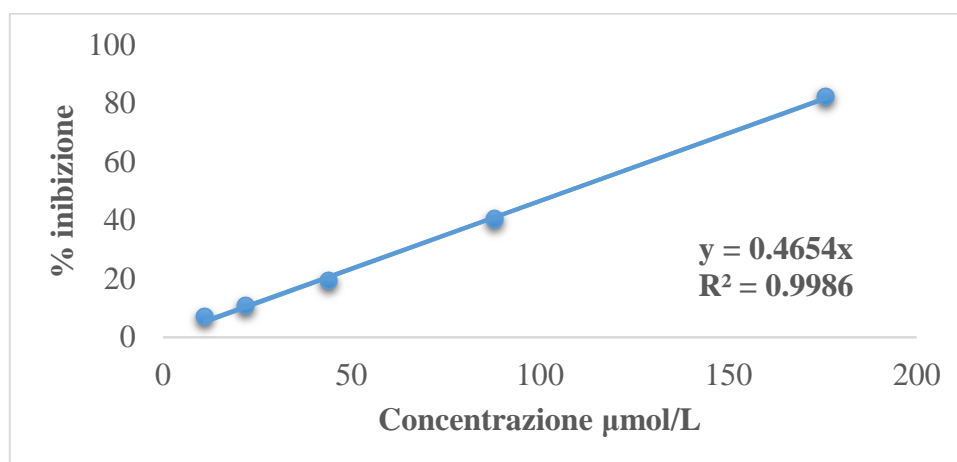


Figura 32 – Retta di taratura del Trolox utilizzata per il dosaggio dell'attività antiossidante.

3.6 ANALISI DEL PROFILO FENOLICO IN HPLC

Per l'analisi del profilo fenolico dei campioni di birra si è deciso di dosare, nello specifico, acidi fenolici come acido gallico, acido caffeico, acido ferulico, acido p – cumarico; la scelta è ricaduta su questi composti in quanto i risultati possono essere confrontati più facilmente con i dati bibliografici oggi a disposizione.

Il saggio è stato condotto tramite HPLC in fase inversa in cui viene utilizzato un rilevatore a diodi per l'identificazione; il valore delle lunghezze d'onda di eccitazione sono rispettivamente di 280 nm, per quanto riguarda acido gallico ed acido p – cumarico, e di 340 nm, per quel che concerne acido ferulico ed acido caffeico.

Per questo tipo di analisi si è proceduto con l'iniettare, mediante una specifica siringa, un'aliquota del campione tal quale in esame, precedentemente filtrato, in un sistema cromatografico sfruttante una fase mobile costituita da una soluzione B (acqua ed acido formico al 5%), ed una soluzione D (metanolo ed acido formico al 5%), con corse della durata di 70 minuti caratterizzate dal gradiente di seguito descritto:

- min 0: fase B 95% / fase D 5%;
- min 5: fase B 95% / fase D 5%;
- min 10: fase B 88% / fase D 12%;
- min 13: fase B 88% / fase D 12%;
- min 35: fase B 71% / fase D 29%;
- min 50: fase B 54% / fase D 46%;
- min 52: fase B 20% / fase D 80%;
- min 57: fase B 20% / fase D 80%;
- min 60: fase B 0% / fase D 100%;
- min 70: fase B 95% / fase D 5%.

Come per i saggi di natura spettrofotometrica anche in questo caso, per la quantificazione, sono state utilizzate delle rette di taratura ottenute

riportando in ascissa concentrazioni note dell'acido fenolico standard (ppm), opportunamente diluito, ed in ordinata le rispettive aree dei picchi (mAU) calcolate e riportate sul cromatogramma (Fig. 33 – 36).

La concentrazione degli acidi fenolici, espressa in mg/L, è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$\text{Acido Fenolico (mg/L): } [(Area \text{ del picco} / pendenza \text{ retta})]$$

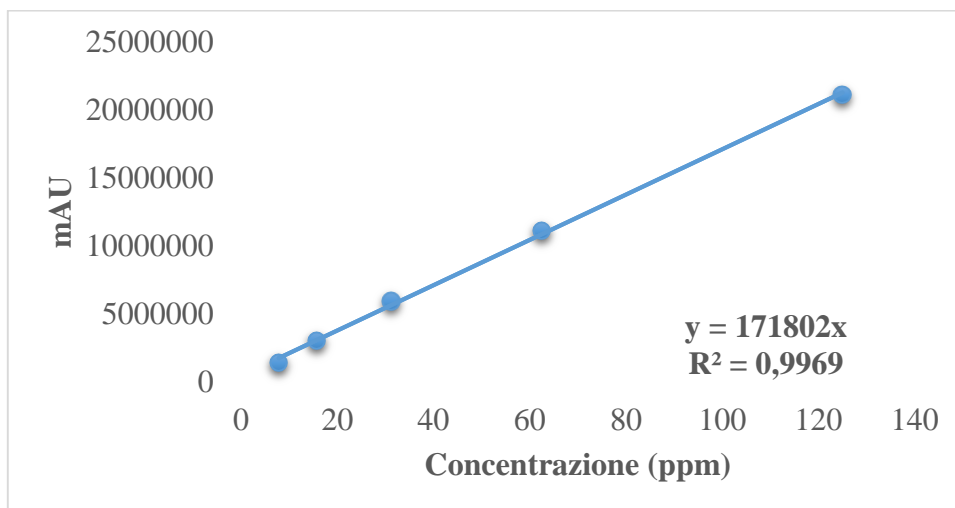


Figura 33 – Retta di taratura dell'acido gallico utilizzata per l'analisi del profilo fenolico in HPLC.

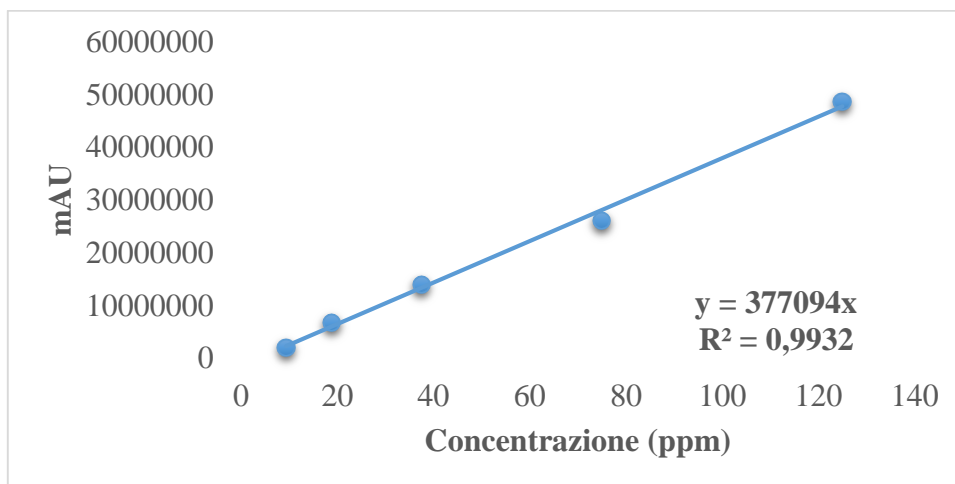


Figura 34 – Retta di taratura dell'acido ferulico utilizzata per l'analisi del profilo fenolico in HPLC.

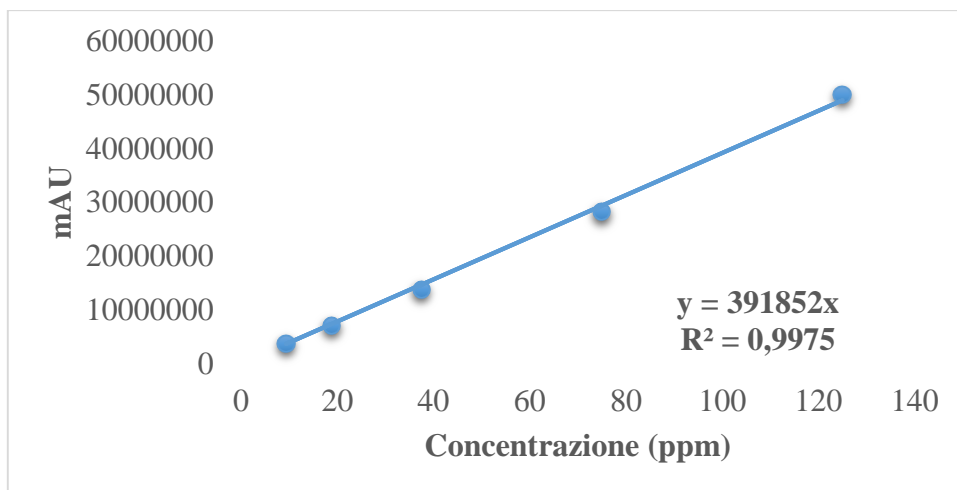


Figura 35 – Retta di taratura dell'acido caffeico utilizzata per l'analisi del profilo fenolico in HPLC.

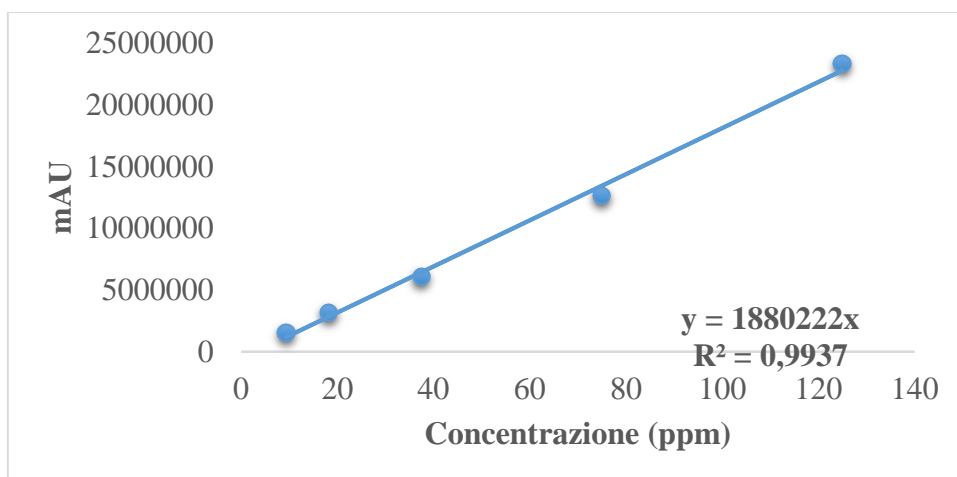


Figura 36 – Retta di taratura dell'acido p – cumarico utilizzata per l'analisi del profilo fenolico in HPLC.

3.7 ABBATTIMENTO E DOSAGGIO DEL GLUTINE TOTALE

Per abbattere il quantitativo di glutine totale sono stati utilizzati due differenti approcci in birrificio: si è proceduto impiegando, per la produzione dell'Accademica (Belgian Ale), un malto base con caratteristiche peculiari mentre per quanto riguarda le birre Lokomotiv (Blanche) ed Ipagea (White IPA) si è deciso di testare un particolare coadiuvante tecnologico.

3.7.1 MALTO DINGEMANS PALE ALE

Il malto base utilizzato per la produzione della ricetta Accademica è, per l'appunto, il Dingemans Pale Ale, una tipologia di malto chiaro utilizzato soprattutto per la produzione di birre belghe ed inglesi.

Sebbene il produttore indichi chiaramente come questo possa essere utilizzato fino ad una percentuale del 100% per ogni ricetta, nel nostro caso invece si è deciso di impiegarlo in una percentuale del 92.5% abbinandovi alcune tipologie di malti scuri in modo tale da produrre una birra esclusivamente di malto d'orzo dal colore rosso – ambrato (Tab. 7).

Malto	Tipologia	(%)
Dingemans Pale Ale	Base / Chiaro	92.5
Dingemans Biscuit	Caratterizzante / Scuro	3
Dingemans Aromatic Malt	Caratterizzante / Scuro	3
Weyermann Carafa Special Malt	Caratterizzante / Scuro	1.5

Tabella 7 – Grist dei malti della ricetta Accademica.

Per ottimizzare l'abbattimento del glutine si è deciso di prendere, per la ricetta Accademica, una serie di accorgimenti tecnologici quali: inizio della fase di ammostamento direttamente a 66 – 67 °C evitando così la sosta

proteica, bollitura prolungata per circa 90 minuti con una fermentazione di circa un mese (7 gg a 17 °C passati i quali la temperatura è stata portata progressivamente a 4°C) in una sorta di pseudo lagerizzazione della nostra birra.

3.7.2 SPINDASOL SB1

Lo Spindasol SB1 (Fig. 37), prodotto e commercializzato dalla AEB group, è il coadiuvante tecnologico impiegato per l'abbattimento della frazione glutinica nelle ricette Lokomotiv ed Ipagea contenenti oltre al classico malto d'orzo, anche frumento ed avena.



Figura 37 – Spindasol SB1

Spindasol SB1 è uno speciale sol di silice al 30% in soluzione colloidale adatto alla chiarifica del mosto caldo nel whirlpool per mezzo di una sedimentazione veloce del “trub” (terminologia utilizzata per indicare il sedimento che si forma al termine della bollitura costituito ad esempio da residui di luppolo e composti tanno – proteici).

Nello specifico, la reazione tra le cariche opposte del sol di silice ed i torbidi del mosto, determina la formazione di flocculi ad alto peso specifico i quali

andranno a sedimentare con velocità sostenuta formando un cono compatto al centro del whirlpool (Fig. 38). L'azienda produttrice specifica inoltre come il coadiuvante possa essere impiegato con dosaggi che vanno dai 15 ai 30 g/hl; nel nostro caso si è deciso di impiegare il dosaggio minimo (15 g/hl).



Figura 38 – Trub formatosi al centro del whirlpool a seguito dell'impiego del coadiuvante Spindasol SB1; le immagini si riferiscono a due momenti ben distinti e cioè durante (a sinistra) ed al termine (a destra) della fase di trasferimento del mosto di birra al fermentatore.

3.7.3 RIDASCREEN GLIADIN COMPETITIVE ELISA KIT

Il metodo ufficiale standard per la determinazione del glutine, secondo il Codex Alimentarius, è un test ELISA che utilizza l'anticorpo monoclonale R5 il quale è in grado di riconoscere, oltre ad altre, la sequenza tossica QQPFP (Glutamina – Glutamina – Prolina – Fenilalanina – Prolina) espressa ripetutamente nelle molecole di prolamine.

Oggi esistono in commercio due differenti kit che sfruttano tale anticorpo: il kit RIDASCREEN Gliadin (ELISA sandwich) ed il kit RIDASCREEN Gliadin Competitive (Elisa competitivo); tuttavia i test ELISA in formato sandwich non sono in grado di rilevare piccole e singole sequenze di peptidi poiché, per la loro esecuzione, sono necessari almeno due epitopi a differenza dei test immunoenzimatici competitivi i quali sono in grado di

rilevare la presenza dei singoli frammenti peptidici in quanto basati sul riconoscimento del singolo epitopo.

Per questo motivo oggi il kit più adatto per il dosaggio del glutine, anche nella birra, è dato dal RIDASCREEN Gliadin Competitive il quale è stato validato da AACCI ed è metodo ufficiale AACCI 38 – 55.01.

Le nostre birre sono state analizzate mediante il RIDASCREEN Gliadin Competitive Kit; tale test è basato su una reazione antigene – anticorpo; viene impiegata una micropiastra a 96 pozzetti rivestita con gliadina all'interno dei quali vengono aggiunti rispettivamente gli standard (miscela di grano, segale ed orzo), la soluzione campione e gli anticorpi anti – gliadina coniugati con perossidasi (coniugati con anticorpi R5 monoclonali). La gliadina libera e quella legata competono per i siti di legame degli anticorpi in modo tale che durante il lavaggio venga eliminato l'enzima coniugato che non si è legato. Ai pozzetti viene poi aggiunta ed incubata la soluzione substrato – cromogeno. L'enzima coniugato legato converte poi il cromogeno in un prodotto blu. L'aggiunta finale della soluzione di stop determina il viraggio del colore dal blu al giallo; la misurazione fotometrica viene infine condotta a 450 nm con un assorbimento che risulterà essere inversamente proporzionale alla concentrazione dei peptidi prolamminici presenti nel campione.

Di seguito viene descritto il protocollo per l'esecuzione del test fornito dall'azienda produttrice il kit (R – Biopharm AG) (Fig. 39):

- 1 ml di campione di birra viene miscelato con 9 ml di soluzione di etanolo al 60% contenente il 10% di gelatina di pesce miscelando con cura per circa 30 secondi mediante vortex ed agitando successivamente per inversione per 10 minuti;
- Centrifugare a 2500 g per 10 minuti a temperatura ambiente (20 – 25°C);

- Diluire ulteriormente il surnatante 1:50 con il diluente del campione; i surnatanti ottenuti dalla centrifugazione possono essere conservati a temperatura ambiente (20 – 25°C) fino a quattro settimane;
- Nel momento in cui deve essere eseguito il test si pipettano nei vari pozzetti 50 µl di standard e di campione opportunamente diluito;
- Successiva aggiunta di 50 µl di enzima coniugato diluito in ogni pozzetto miscelando delicatamente tramite lenta oscillazione manuale della piastra; il tutto viene poi incubato a temperatura ambiente (20 – 25°) per 30 minuti;
- Eliminare il liquido dai pozzetti e picchiettare energicamente per tre volte la piastra capovolta su carta assorbente per eliminare ogni residuo di liquido;
- Riempire i pozzetti con 250 µl di tampone di lavaggio diluito svuotandoli nuovamente. Tale operazione va ripetuta altre due volte;
- Aggiungere in ogni pozzetto 100 µl di substrato – cromogeno agitando delicatamente e facendo oscillare manualmente la piastra incubandola poi per 10 minuti a temperatura ambiente (20 – 25°C) ed al buio;
- Aggiungere infine 100 µl di soluzione di stop in ogni pozzetto miscelando delicatamente tramite oscillazione manuale della piastra;
- Leggere il valore di assorbanza a 450 nm entro 10 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

Per la quantificazione finale di analisi eseguite con i kit RIDASCREEN è disponibile un apposito software, denominato RIDA SOFT Win. Per ottenere la concentrazione di gliadina in ng/ml è necessario moltiplicare la concentrazione letta sulla curva di calibrazione per il fattore di diluizione 500 (nel caso in cui vengano utilizzate diluizioni differenti rispetto a quelle indicate sarà necessario tenerne conto per il calcolo).

Il quantitativo di glutine totale presente nel campione in analisi viene infine espresso in mg/kg (ppm).



Figura 39 – Kit RIDASCREEN Gliadin Competitive prodotto dalla R – Biopharm AG impiegato per il dosaggio del glutine della birra.

4. RISULTATI

4.1 DOSAGGIO DELLA COMPONENTE FENOLICA

TOTALE

L'analisi della componente fenolica totale, mediante saggio di Folin – Ciocalteu, sui nostri campioni di birra ha prodotto i risultati di seguito riportati (Fig. 40).

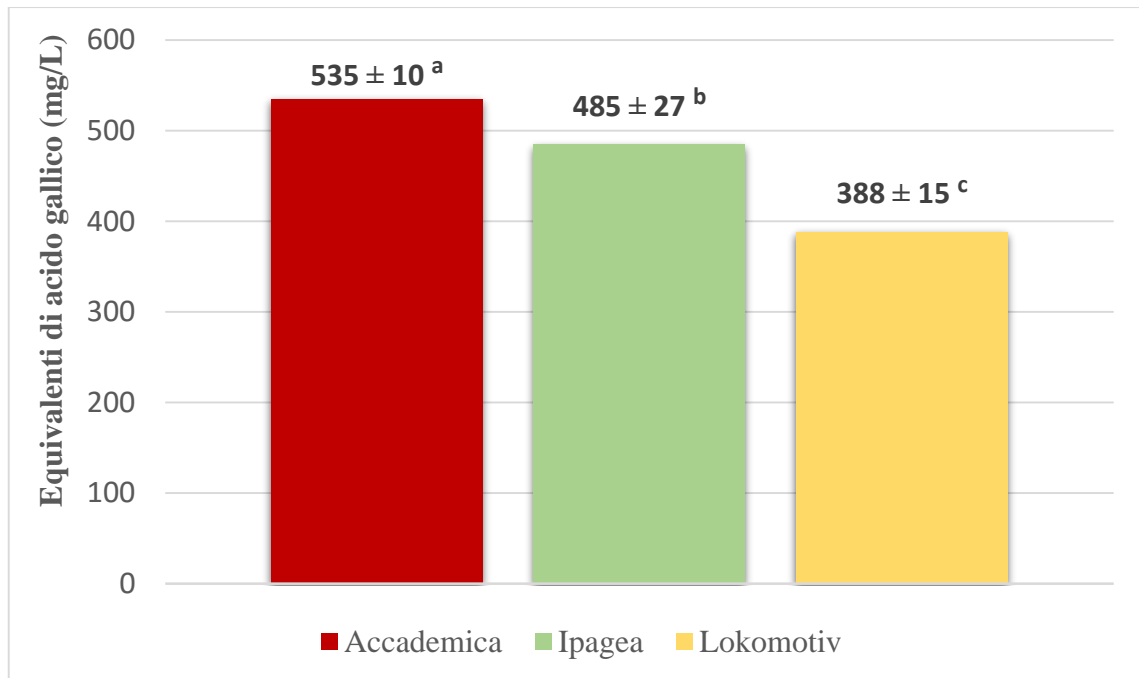


Figura 40 – Risultati del saggio di Folin – Ciocalteu sui campioni di birra in esame. I dati rappresentano la media di tre repliche e, per ciascun parametro analizzato, lettere differenti corrispondono a valori significativamente differenti in seguito ad ANOVA ad una via, seguita da test Tukey – Kramer ($P < 0.05$); \pm = Deviazione Standard.

Dall'analisi dei dati risulta evidente come la ricetta Accademica presenti il contenuto fenolico totale più elevato e superiore, nello specifico, del 10% e del 38% rispetto alle ricette Ipatea e Lokomotiv; soffermandoci poi sui dati relativi alle due birre di frumento vediamo come, a parità di grist, nella prima (Ipatea) vi sia un incremento di sostanze fenoliche del 25% rispetto alla seconda (Lokomotiv).

Possiamo quindi affermare come sia l'utilizzo dei malti scuri che del Dry Hopping a fine fermentazione agiscono positivamente sull'apporto di

sostanze fenoliche alla birra artigianale finita tenendo però presente il fatto che anche i dati relativi alla ricetta Lokomotiv sono estremamente positivi.

4.2 DOSAGGIO DEI FLAVONOIDI TOTALI

In questo paragrafo sono riportati i dati relativi al saggio dei flavonoidi totali effettuato sulle birre in esame (Fig. 41).

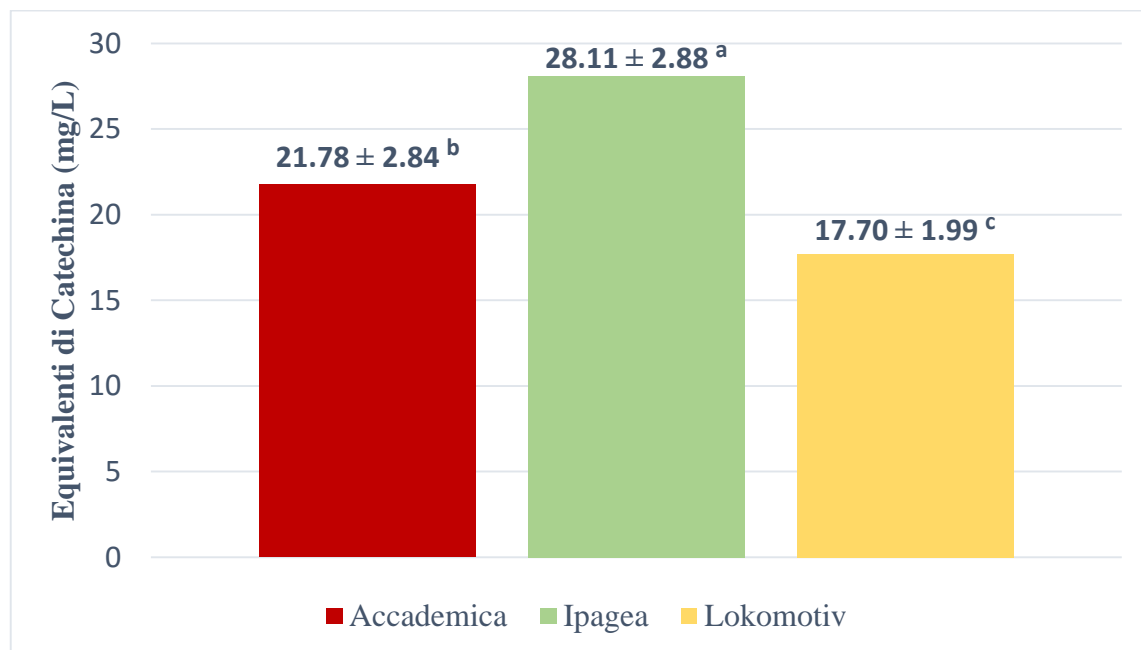


Figura 41 – Risultati del saggio relativo ai flavonoidi totali sui campioni di birra in esame. I dati rappresentano la media di tre repliche e, per ciascun parametro analizzato, lettere differenti corrispondono a valori significativamente differenti in seguito ad ANOVA ad una via, seguita da test Tukey – Kramer ($P < 0.05$); \pm = Deviazione Standard.

In questo caso è la ricetta Ipagea ad aver mostrato il risultato migliore con un contenuto in termini di flavonoidi totali superiore del 29% e del 59% rispetto alle ricette Accademica e Lokomotiv. E' importante sottolineare come da un lato, l'utilizzo del Dry Hopping abbia un impatto molto importante sull'apporto di flavonoidi al prodotto finito (basta confrontare i dati relativi alle ricette Ipagea e Lokomotiv) mentre dall'altro, l'utilizzo di una percentuale relativamente bassa in termini di malti scuri permette comunque di migliorare, a parità di luppolatura, l'apporto in flavonoidi; a tal proposito, la ricetta Accademica presenta una quantità di flavonoidi totali superiore di circa il 23% rispetto alla ricetta Lokomotiv (birre con un grado di luppolatura pressoché identica).

4.3 DOSAGGIO DELL'ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

L'analisi dell'attività antiossidante, mediante saggio ABTS, ha prodotto i risultati di seguito riportati (Fig. 42).

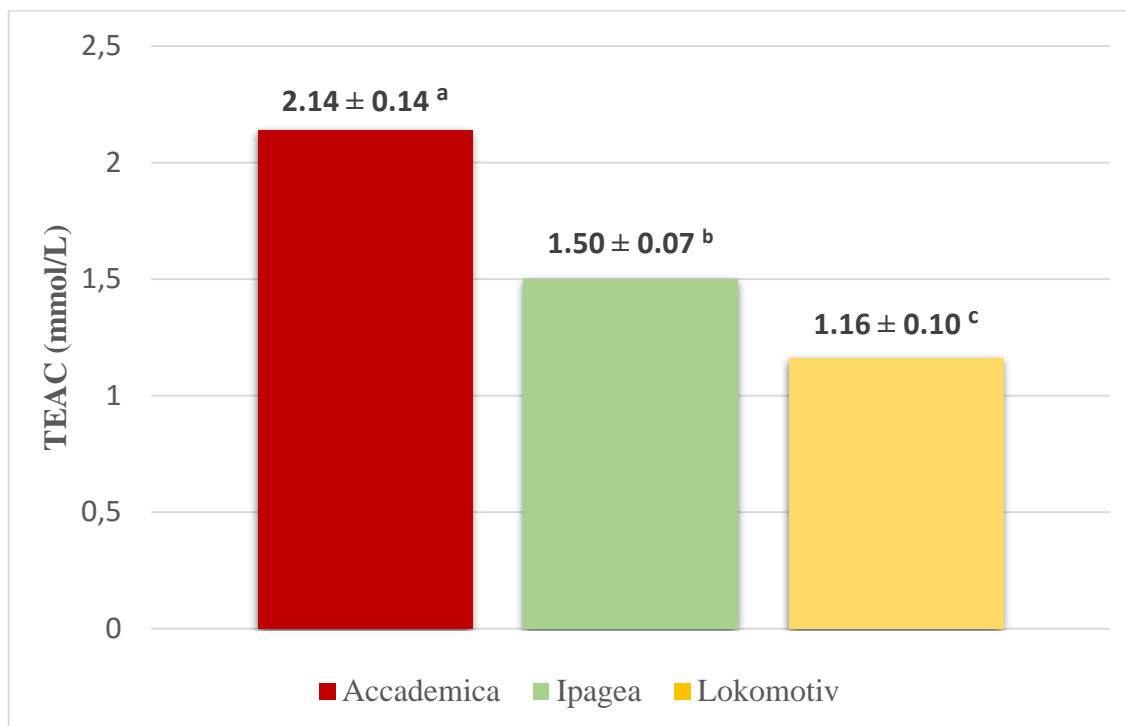


Figura 42 – Risultati del saggio ABTS sui campioni di birra in esame. I dati rappresentano la media di tre repliche e, per ciascun parametro analizzato, lettere differenti corrispondono a valori significativamente differenti in seguito ad ANOVA ad una via, seguita da test Turkey – Kramer ($P < 0.05$); \pm = Deviazione Standard.

Analogamente a quanto riscontrato col saggio di Folin – Ciocalteau, anche in questo caso è la ricetta Accademica a mostrare il valore più elevato a seguito del saggio dell'ABTS radicalico. I malti scuri svolgono indubbiamente un ruolo cruciale nell'apporto di attività antiossidante al prodotto finito con percentuali di molto superiori a quelle registrate nelle altre due tipologie di birra; nello specifico, la ricetta Accademica mostra un'attività antiossidante superiore, rispettivamente del 43% e dell'84% nei confronti delle ricette Ipagea e Lokomotiv; confrontando i dati relativi a quest'ultime vediamo come, anche in questo caso, l'apporto di luppolo a freddo ha determinato un incremento dell'attività antiossidante pari a circa il

30%. Malti scuri e luppolatura a freddo agiscono quindi positivamente sull'apporto di molecole ad attività antiossidante nella birra artigianale finita.

4.4 ANALISI DEL PROFILO FENOLICO IN HPLC

Il dosaggio degli acidi fenolici in HPLC ha prodotto i risultati di seguito riportati (Fig. 43 – 46).

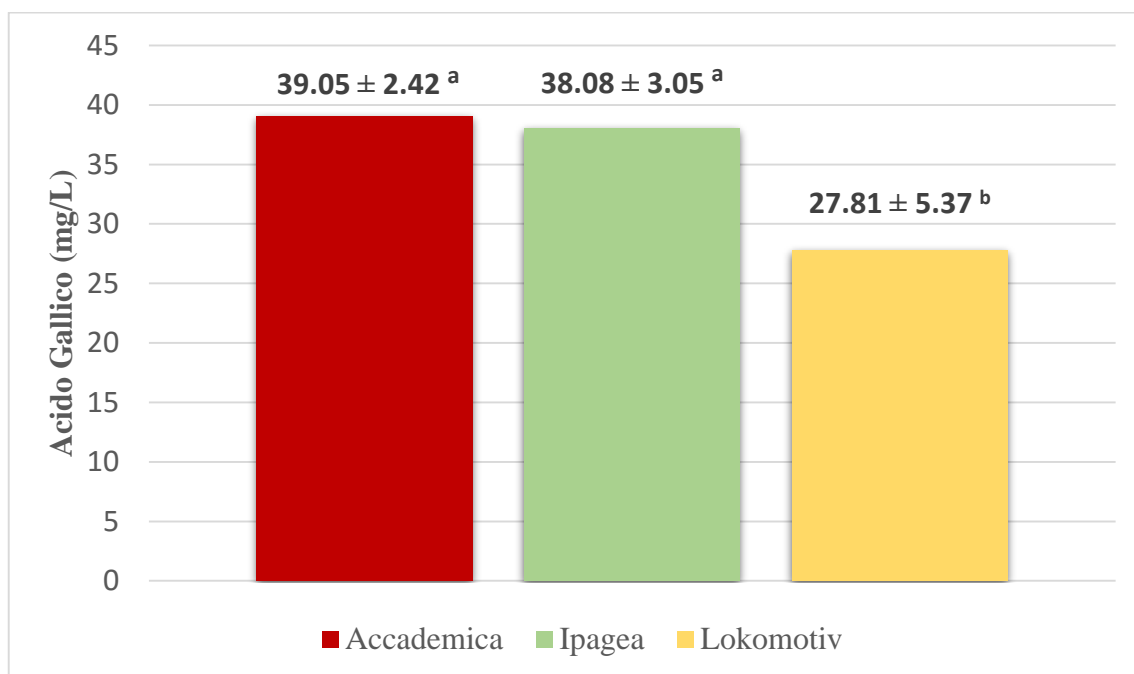


Figura 43 – Acido gallico (mg/L) dosato in HPLC. I dati rappresentano la media di tre repliche e, per ciascun parametro analizzato, lettere differenti corrispondono a valori significativamente differenti in seguito ad ANOVA ad una via, seguita da test Turkey – Kramer ($P < 0.05$); \pm = Deviazione Standard.

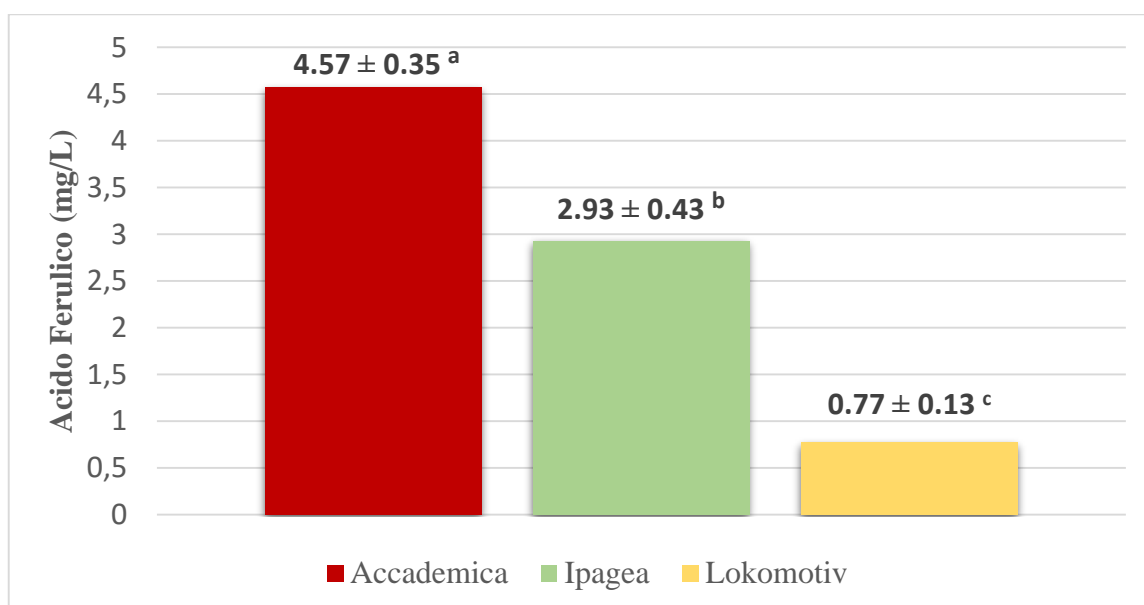


Figura 44 – Acido ferulico dosato in HPLC. I dati rappresentano la media di tre repliche e, per ciascun parametro analizzato, lettere differenti corrispondono a valori significativamente

differenti in seguito ad ANOVA ad una via, seguita da test Turkey – Kramer ($P < 0.05$); \pm = Deviazione Standard.

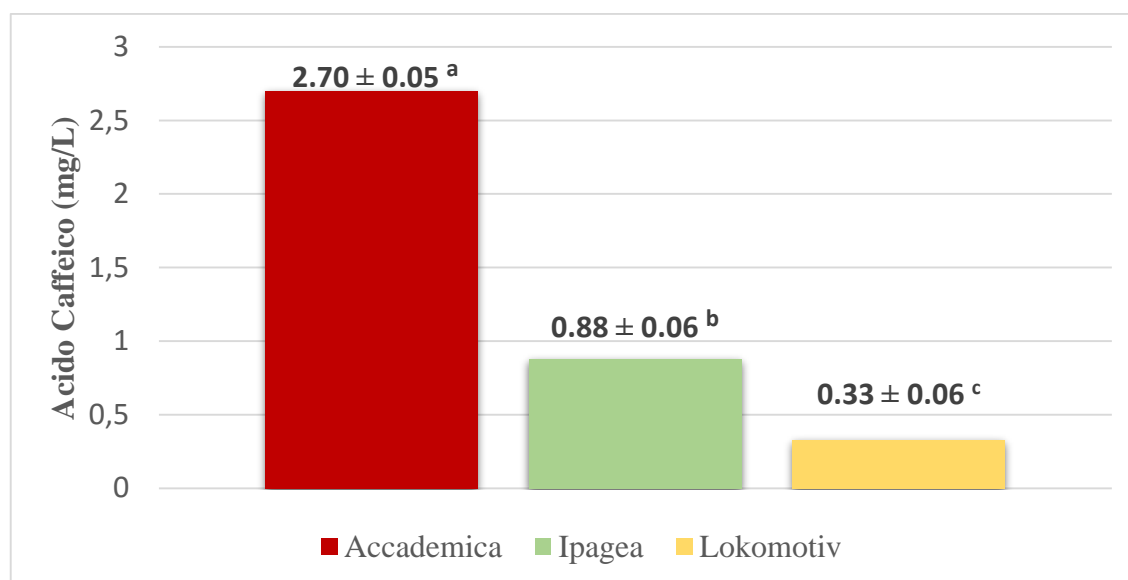


Figura 45 – Acido caffeico dosato in HPLC. I dati rappresentano la media di tre repliche e, per ciascun parametro analizzato, lettere differenti corrispondono a valori significativamente differenti in seguito ad ANOVA ad una via, seguita da test Turkey – Kramer ($P < 0.05$); \pm = Deviazione Standard.

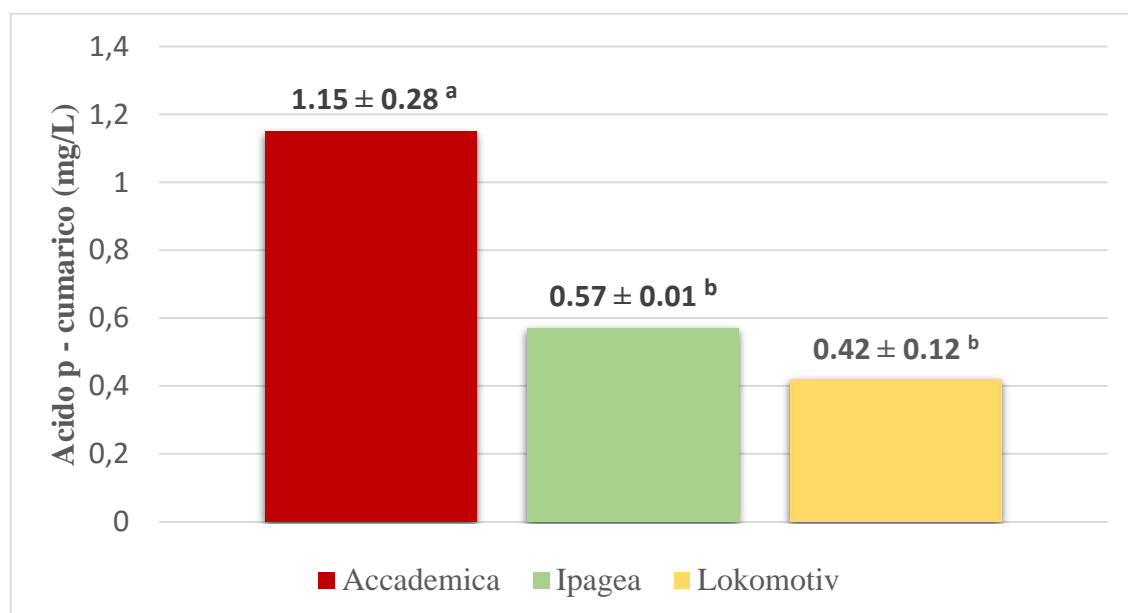


Figura 46 – Acido p - cumarico dosato in HPLC. I dati rappresentano la media di tre repliche e, per ciascun parametro analizzato, lettere differenti corrispondono a valori significativamente differenti in seguito ad ANOVA ad una via, seguita da test Turkey – Kramer ($P < 0.05$); \pm = Deviazione Standard.

Un primo e fondamentale aspetto che si evince dai dati riportati è il rapporto costante in termini di quantità dei singoli acidi fenolici; in tutti i nostri campioni l'acido gallico risulta essere l'acido fenolico più rappresentato seguito rispettivamente da acido ferulico, acido caffeico ed acido p – cumarico; questa caratteristica, è fondamentale sottolinearlo, è conforme con quanto riscontrato, ad esempio, nello studio condotto da Zhao *et al.* (2010) in cui si registra la medesima proporzionalità. Nello specifico, la ricetta Accademica risulta essere quella con la quantità in acidi fenolici più elevata seguita, rispettivamente da Ipagea e Lokomotiv.

Un secondo importante aspetto è legato al fatto che la somma totale dei quattro acidi fenolici segue l'andamento che si era riscontrato a livello della componente fenolica totale (Accademica > Ipagea > Lokomotiv) anche se, è bene sottolinearlo, i dati presenti in bibliografia certificano come non sempre vi sia un rapporto di proporzionalità diretta tra quantità fenolica totale ed effettiva presenza degli acidi fenolici più importanti.

4.5 ABBATTIMENTO E DOSAGGIO DEL GLUTINE

TOTALE

Le analisi relative al dosaggio del glutine totale sui campioni di birra in esame sono state effettuate presso i laboratori del CERB di Perugia (Centro di Eccellenza per la Ricerca sulla Birra); i risultati ottenuti vengono di seguito riportati (Fig. 47).

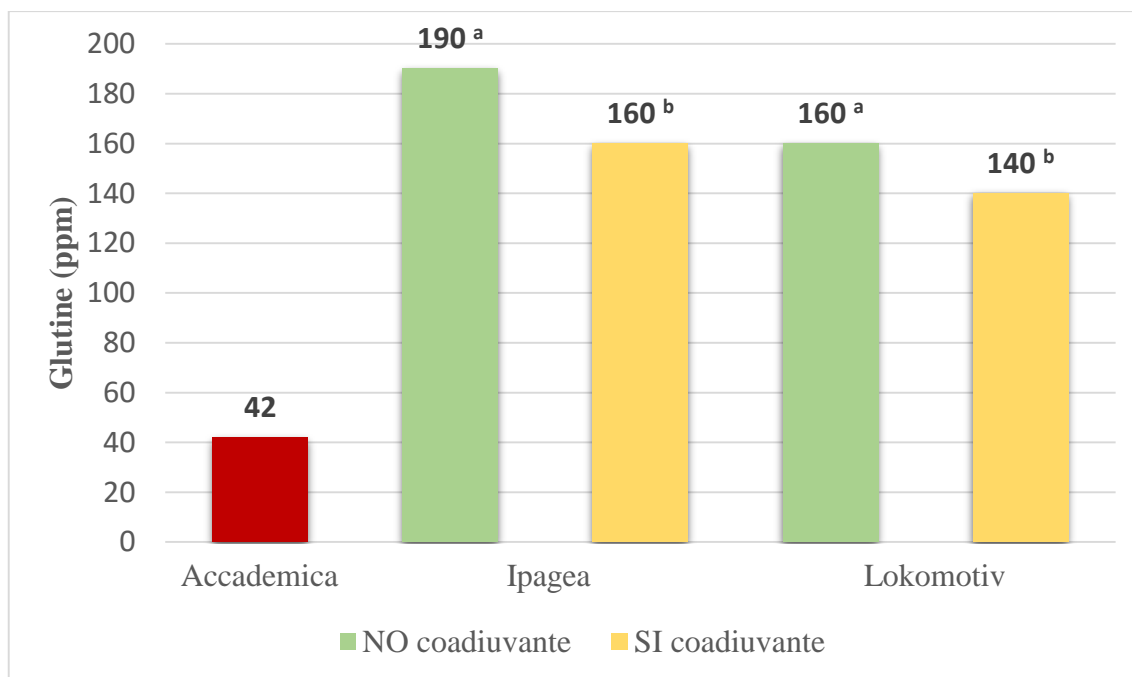


Figura 47 – Risultati del dosaggio del glutine totale sui campioni in esame; il metodo utilizzato è l'ELISA R5 Gliadin Competitive. Per ciascun parametro analizzato, lettere differenti corrispondono a valori significativamente differenti in seguito ad ANOVA ad una via, seguita da test Turkey – Kramer ($P < 0.05$).

Dai risultati ottenuti notiamo come la ricetta Accademica abbia un quantitativo di glutine estremamente più basso rispetto alle ricette Ipaga e Lokomotiv; questi dati trovano riscontro nel fatto che mentre per la produzione della ricetta Accademica si è utilizzato esclusivamente malto d'orzo, nelle ricette Ipaga e Lokomotiv si è proceduto impiegando anche cereali come frumento ed avena: è normale quindi che, in questo caso, una birra di solo malto d'orzo come l'Accademica presenti un quantitativo di glutine totale inferiore, mediamente di circa il 75% rispetto alle ricette di

frumento caratterizzate, invece, da un frazione glutinica molto simile; anche quest'ultimo aspetto trova riscontro nel fatto che Ipagea e Lokomotiv presentano un pressoché identico grist dei malti. La ricetta Accademica con i suoi 42 ppm di glutine rientra tranquillamente nel range 20 – 100 ppm ovvero quello che definisce gli alimenti a basso contenuto di glutine.

L'azione dello Spindasol SB1 ha prodotto, inoltre, un abbattimento effettivo del glutine totale, quando utilizzato; nello specifico il chiarificante ha prodotto una diminuzione della frazione glutinica pari al 15% nella ricetta Ipagea e del 12.5% nella ricetta Lokomotiv. In questo frangente siamo al di sopra dei 100 ppm anche se tuttavia, è bene ricordarlo, il coadiuvante tecnologico è stato utilizzato col dosaggio più basso indicato in etichetta.

5. DISCUSSIONE

Per quanto riguarda in generale i composti ad attività antiossidante la ricetta che ha mostrato i risultati migliori è stata senza dubbio l'Accademica che, nello specifico, si è dimostrata più ricca rispetto alle altre due ricette in termini di componente fenolica totale, attività antiossidante totale e singoli acidi fenolici mentre in relazione ai flavonoidi totali il dato migliore è stato invece riscontrato a livello della ricetta Ipagea; questo è dovuto probabilmente al fatto che una prolungata permanenza in fermentatore della ricetta Accademica ha determinato, nella stessa, una maggiore precipitazione dei complessi tanno – proteici con ripercussione sia in termini di flavonoidi totali sia per quanto riguarda il glutine totale.

Questi risultati ci permettono, soprattutto se confrontati con quelli relativi alla ricetta Lokomotiv, di poter affermare e ribadire come sia l'utilizzo dei malti scuri sia l'impiego del Dry Hopping a fine fermentazione abbiano un impatto estremamente positivo sulle componenti antiossidanti nella birra artigianale finita; l'effetto più importante è legato sicuramente all'utilizzo dei malti scuri soprattutto se si tiene conto del fatto che la percentuale di utilizzo nella ricetta Accademica è stata del 7.5%, con quest'ultima che può essere tuttavia aumentata fino al 22%; l'impiego di una percentuale relativamente bassa in termini di malti scuri è quindi già sufficiente per l'ottenimento di risultati estremamente soddisfacenti.

Un altro aspetto da sottolineare è legato al valore che assumono i nostri risultati se paragonati con dati bibliografici relativi alle birre Lager ed al vino bianco.

In generale possiamo affermare come, a parità di stile, le ricette ad alta fermentazione presentano risultati migliori rispetto alle ricette ad impostazione maggiormente industriale in relazione a tutte le componenti analizzate nel presente lavoro di tesi. Dal materiale bibliografico consultato si evince come, per il contenuto fenolico totale, il valore più elevato

riscontrato nelle Lager sia rappresentato dal valore di 330 mg/L (Zhao *et al.*, 2010) il quale viene ampiamente superato dalle Ale analizzate. Inoltre, i dati ottenuti possono essere tranquillamente paragonati a quelli registrati nel vino bianco; ad esempio, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) stabilisce come tenore minimo in polifenoli del vino bianco il valore di 200 mg/L anche se, è fondamentale sottolinearlo, nella maggior parte degli studi condotti sui vini bianchi questo viene ampiamente superato attestandosi in media intorno ai 300 – 350 mg/L (Mitic *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012) e nonostante non vi sia un limite massimo prestabilito, dal materiale consultato in rete si evince come il contenuto fenolico totale massimo registrato si attesta, nel prodotto vino bianco, intorno ai 500 – 600 mg/L.

Per quel che concerne i flavonoidi totali si conferma il fatto che tali metaboliti rappresentano una minima parte dei composti fenolici totali della birra questo perché la maggior parte tende a precipitare sotto forma di complessi tanno – proteici durante la bollitura e la fermentazione; nonostante non sia stato possibile reperire del materiale bibliografico relativo ad uno studio completo su tali composti è abbastanza plausibile che i dati ottenuti siano di molto superiori rispetto alle birre industriali soprattutto se si analizzano i dati relativi a catechina, epicatechina e xantumolo, tra i principali flavonoidi presenti nella birra finita (Wunderlich *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2010; Magalhaes *et al.*, 2011). Per quel che concerne il vino bianco, in questo caso il gap con i nostri campioni è maggiore ma non incolmabile dal momento che, in tale prodotto, i flavonoidi rappresentano circa il 20% dei composti fenolici totali con un valore che non supera, mediamente, i 50 mg/L (Stratil *et al.*, 2008).

Il trend si conferma anche analizzando i dati relativi alle attività antiossidanti; le nostre birre ad alta fermentazione presentano valori superiori mediamente alle ricette Lager il cui valore medio in termini di attività antiossidante è di circa 1 mmmol/L; quest'ultimo rappresenta un

valore indicativo medio in quanto in bibliografia è riportato generalmente un valore inferiore a quello precedentemente indicato; tuttavia, esistono naturalmente casi nei quali tale valore viene superato e, nella maggior parte dei casi, questo superamento coinvolge ricette rosso – ambrate o addirittura nere confermando così il ruolo decisivo dei malti scuri nel conferimento di migliori attività antiossidanti al prodotto finito (Tubaro, 2009; Zhao *et al.*, 2010). I dati della ricetta Accademica sono importanti in quanto si avvicinano maggiormente ai valori massimi riscontrati sui vini bianchi e rappresentati dal range di 3.20 – 8.44 mmol/L (Stratil *et al.*, 2008; Magalhaes *et al.*, 2014); in questo caso è presumibile ritenere che aumentando la percentuale in malti scuri impiegata si possa raggiungere tranquillamente questo range tenendo presente il fatto che, oltre alla ricetta Accademica anche Ipagea e Lokomotiv presentano valori in termini di attività antiossidante compatibili, ed in alcuni casi anche superiori, con dati bibliografici visionati e relativi a differenti tipologie di vini bianchi (De Beer *et al.*, 2003; Villano *et al.*, 2004).

L'analisi dei dati relativi ai singoli acidi fenolici ci permettono di confermare gli aspetti già descritti; si nota come da un lato, nelle tre birre artigianali questi siano superiori rispetto a quelli relativi ai valori nelle ricette Lager e riportate nello studio di Zhao *et al.* (2010) e dall'altro, come gli stessi siano paragonabili ai valori riscontrati in differenti studi sui vini bianchi (Soleas *et al.*, 1997; Gorinstein *et al.*, 2000; Young – In, 2007).

Per quanto riguarda invece il glutine totale della birra artigianale i risultati ottenuti sono estremamente incoraggianti e senza dubbio veritieri; a conferma del fatto che l'approccio competitivo sia maggiormente funzionale e preciso per questo tipo di saggio c'è da dire che è stato condotto uno studio da Van Landschoot (2011) nel quale sono stati dosati i livelli di glutine su 58 birre commerciali utilizzando entrambi i test immunoenzimatici (sandwich e competitivo). I risultati hanno dimostrato come utilizzando

l'approccio sandwich circa l'83% dei campioni analizzati risultava essere Gluten – Free; tale percentuale tuttavia si abbassava notevolmente nel momento in cui i campioni Gluten – Free venivano analizzati mediante il test competitivo.

Uno studio analogo, da cui sono scaturite le medesime considerazioni, è stato condotto da Guerdrum & Bamforth (2011).

L'approccio tecnologico impiegato per la produzione della ricetta Accademica si è rivelato vincente in quanto si è riusciti a produrre una birra artigianale a basso contenuto di glutine impiegando, per la produzione, le materie prime classiche ed andando semplicemente ad affinare le varie fasi del processo produttivo; aspetto ancor più confortante sta nel fatto che il valore di 42 ppm è sicuramente molto più vicino al valore di 20 ppm (limite massimo per il Gluten – Free) rispetto ai 100 ppm (limite massimo per il Low – Gluten). In particolar modo decisiva si è rivelata la decisione di utilizzare, come malto base, il Dingemans Pale Ale in funzione delle caratteristiche tecniche dello stesso: questo, nello specifico, si caratterizza per un contenuto proteico totale del 9.53% del quale soltanto il 3.85% rappresentato dalla componente solubile e specificamente responsabile della formazione della frazione glutinica presente nella birra finita.

Nelle ricette di frumento Ipagea e Lokomotiv lo Spindasol, utilizzato col minimo dosaggio, ha effettivamente determinato un abbattimento del glutine totale ma in maniera limitata; i valori di 160 ppm (Ipagea) e 140 ppm (Lokomotiv) restano comunque al di sopra dei limiti imposti dalla normativa. Tale coadiuvante ha mostrato aspetti positivi e negativi: tra i primi mettiamo sicuramente una maggiore stabilizzazione e digeribilità del prodotto finito alla quale aggiungiamo, paradossalmente, una idoneità di utilizzo maggiore per le ricette maggiormente luppolate nelle quali lo Spindasol, nonostante chiarifichi il prodotto aumentando la precipitazione delle strutture tanno – proteiche, ha la capacità di aumentare la percezione boccale delle

caratteristiche sensoriali del prodotto; purtroppo il coadiuvante ha mostrato un limite evidente e cioè il fatto che esso va a diminuire l'attività antiossidante del prodotto finito. Nello specifico, alla dose utilizzata si è registrata una diminuzione dell'attività antiossidante di circa l'8% ed è lecito presumere che questo abbattimento sia proporzionale al dosaggio impiegato. Si può quindi affermare che l'utilizzo di coadiuvanti come lo Spindasol SB1 deve essere valutato in funzione degli scopi: può essere utile nel caso in cui il prodotto debba essere esportato all'estero mentre, per il suo effetto chiarificante, non è ideale per prodotti artigianali di nicchia.

6. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Concludendo questo lungo percorso possiamo affermare come, in generale, la birra artigianale presenti tutte le caratteristiche tali per cui, se consumata in modo adeguato, può apportare, grazie ai propri metaboliti, benefici all'organismo umano.

Nello specifico, tra quelle analizzate, la ricetta brassicola caratterizzata da un grado di funzionalità maggiore è senza ombra di dubbio l'Accademica: questa birra artigianale presenta, allo stesso tempo, una buona componente antiossidante (fenoli, flavonoidi ed attività antiossidante specifica) ed un basso contenuto di glutine.

Inoltre, in virtù del fatto che l'utilizzo dei malti scuri da un lato e l'impiego della luppolatura a freddo dall'altro determinano un incremento positivo di tutte le componenti analizzate si può supporre, empiricamente, che le ricette brassicole nelle quali si agisce in modo deciso in termini di luppolatura e/o utilizzo di malti scuri sono quelle per le quali è lecito attendersi una funzionalità maggiore ed il prodotto che rappresenta meglio queste caratteristiche è rappresentato dallo stile Black IPA.

Per quel che concerne le sfide future, queste sicuramente non mancano nell'ambito della birra artigianale: innanzitutto è necessario mettere a punto processi analitici standardizzati in maniera tale da poter ottenere un migliore confronto dei dati ottenuti; ad oggi, infatti, gli studi condotti sul prodotto birra tendono ad essere estremamente variegati in termini di saggi ed approcci utilizzati. Non meno importante è sicuramente il cercare di evolvere il processo tecnologico in modo tale da poter limitare al minimo la perdita in flavonoidi ed in particolar modo dello xantumolo, tanto abbondante nella materia prima luppolo quanto scarso nella birra finita; inoltre, un altro aspetto da approfondire è legato ai meccanismi molecolari con i quali le melanoidine riescono ad inattivare i radicali liberi contribuendo in maniera così importante al miglioramento delle attività antiossidanti.

Infine, soffermandoci sull'aspetto glutine totale, le sfide future ci impongono di trovare le strategie più adatte per poter produrre birre artigianali Gluten – Free utilizzando, come sempre, le materie prime classiche.

Negli ultimi anni è stato testato con successo un enzima, purificato da *Aspergillus niger* e denominato “Prolyl – Endopeptidase”, il quale ha mostrato la capacità di degradare le strutture proteiche correlate al glutine senza tuttavia alterare le componenti antiossidanti della birra e, cosa ancora più confortante, di riuscire nel 100% dei casi in cui è stato utilizzato a rendere il prodotto Gluten – Free permettendo in questo modo di scendere al di sotto del limite di 20 ppm (Van Landschoot, 2011).

In virtù di quanto affermato, la strategia futura più appropriata è rappresentata dall'utilizzo del suddetto enzima nella ricetta Accademica, in modo tale da poter così abbattere ulteriormente il quantitativo di glutine totale, già basso fisiologicamente, sperando così di ottenere una birra artigianale di malto d'orzo adatta anche a persone affette da patologie relative alla presenza di glutine negli alimenti.

7. BIBLIOGRAFIA

- Ames, B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, 221: 1256 – 1264.
- Ames, J.M. (2000). Melanoidins as pro – or antioxidants. Training course; Jean De Clerck Chair IX Louvain – de – Neure, Belgium.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., Mc Donald, S. & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183 – 198.
- Arendt, E.K. & Zannini, E. (2013). Cereal grains for the food and beverage industries. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
- Benzie, I.F. (2000) Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. J. Nutr.* 39: 53 – 61.
- Berliner, J.A. & Heinecke, J.W. (1996). The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Rad. Biol. Med.* 20: 770 – 777.
- Blanco, C.A., Rojas, A., Caballero, P.A., Ronda, F., Gomez, M. & Cabellero, I. (2006). A better control of beer properties by predicting acidity of hop iso – α – acids. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 373 – 377.
- Bonnely, S., Peyrat – Maillard, M.N., Rondini, L., Masy, D. & Berset, C. (2000). Antioxidant activity of malt rootlet extracts. *J. Agric. Food Chem*, 48: 2785 – 2792.
- Bottero, L., Dabove, L. & Billia, M. (2009). *Manuale della birra*. Ed. Gribaudo, pp. 34 – 40.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J. Jr. & Krause, K.H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.* Aug 17; 142: w13659.
- Briggs, D.E., Hough, J.S., Stevens, R. & Young, T.W. (1981). Malting and brewing science. Malt and sweet wort. Chapman & Hall, Vol. I.

- Briggs, D., Boulton, C. A., Brookes, P. A. & Stevens, R. (2004). *Brewing: Science and Practice*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
- Buiatti, S. (2004). “Birra”. In Martelli A., Cabras P. (Ed.), *Chimica degli alimenti*, Padova: Piccin Nuova Libreria S.P.A.
- Buiatti, S. (2009). Beer composition: an overview. In: *Beer in Health and Disease Prevention* (edited by V. Preedy), pp. 213 – 225. San Diego, CA: Academy Press.
- Cantoni, C. (1990). *Alimenti microbiologici e igiene*. Johannes Krämer, Milano.
- Cestaro, B. (1994). *Per una vita inossidabile*. Etas Libri RCS – Medicina.
- Chao, C.Y., Mong, M.C., Chan, C.K. & Yin, M.C. (2010). Anti – glycative and anti – inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Mol. Nutr. Food Res*, 54 (3): 388 – 395.
- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan L.J. & Ames B.N. (1995). Oxidative damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 92: 4337 – 4341.
- Chung, W.G., Miranda, C.L., Stevens J.F. & Maier C.S. (2009). Hop proanthocyanidins induce apoptosis, protein carbonylation, and cytoskeleton disorganization in human colorectal adenocarcinoma cells via reactive oxygen species. *Food Chem. Toxicol*, 47: 827 – 836.
- Codex Alimentarius Commission (2009). Commission regulation (EC) No 41/2009 of 20 January 2009 concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten.
- Daniels, R. (2000) *Designing great beers*. Brewers publications, Boulder, Colorado.
- De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C. & Manley, M. (2003). Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (4): 902 – 909.
- De Keukeleire, D. (2000). *Quim Nova* 23: 108 – 112.

- De Keukeleire, D. (2003). Beer, hops, and health benefits. *Scandinavian Brewers's Review*, 60 (2): 10 – 17.
- Del Vecchio, P. (2014). *Storia della birra, dai Sumeri ai giorni nostri*. Edizioni il fiorino.
- Dostalek, P., Hockel, I., Mendez, E., Hernando, A. & Gabroscova, D. (2006). Immunochemical determination of gluten in malts and beers. *Food Additives and Contaminants*, 23: 1074 – 1078.
- Eßlinger, H. M. (2009). Fermentation, maturation and storage. In *Handbook of Brewing: processes, technology, markets*. Ed. H. M. Eßlinger, 207 – 224. Weinheim: Wiley – Vch Verlag GmbH & Co. KGaA.
- European Brewery Convention. (1997). *Hops and hop products, manual of good practice*. Hans Carl Verlag, Nürnberg.
- Fajner, D. (2010). La birra ed i suoi ingredienti: l'acqua. *Movimento birra*, pp. 3, 14 – 15.
- Fasano, A. & Catassi, C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120: 636 – 651.
- Fastigi, M., Esposti, R. & Viganò, E. (2015). The irresistible rise of the craft brewing sector in Italy: can we explain it? Paper prepared for the 4th Aieaa Conference. Ancona.
- Fastigi, M., Esposti, R. & Viganò, E. (2015). La beer craft revolution in Italia e i birrifici agricoli: traiettorie evolutive e principali criticità. *Argomenti* (in press).
- Fulgencio, S.C., Serrano, J. & Perez – Jimenez, J. (2009). What contribution is beer to the intake of antioxidants in the Diet? *Beer in Health and Disease Prevention*, pp 441 – 448.
- Gerhauser, C. (1954). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Cancer*, 41: 1941 – 1954.

- Gerhauser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal – Eldeen, A., Klimo, K., Knauf, J., Neumann, I., Scherf, H.R., Frank, N., Bartsch, H., et al. (2002). Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer. Ther.*, 1: 959 – 969.
- Gorinstein, S., Caspi, A., Zemser, M. & Trakhtenberg, S. (2000). Comparative contents of some phenolic in beer, red and white wines. *Nutr. Res.*, 20 (1): 131 – 139.
- Gorinstein, S., Caspi, A., Libman, I., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Tashma, Z., Katrich, E., Jastrzebski, Z. & Trakhtenberg, S. (2007). Bioactivity of beer and its influence on human metabolism. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 58: 94 – 107.
- Goupy, P., Hugues, M., Boivin, P. & Amiot, M.J. (1999). Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 1625 – 1634.
- Gresser, A. (2010). *Il manuale del birraio pratico*. Fachverlag Hans Carl, Nurnberg, Germania.
- Guerdrum, L.J. & Bamforth, C.W. (2011). Levels of gliadin in commercial beers. *Food Chemistry*, 129: 1783 – 1784.
- Guerdrum, L.J. & Bamforth, C.W. (2012). Prolamin levels through brewing and the impact of prolyl endoproteinase. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 70: 35 – 38.
- Hager, A.S., Taylor, J.P., Waters, D.M. & Arendt E.K. (2014). Gluten free beer – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 36: 44 – 54.
- Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization – methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 49 (10): 1341 – 1348.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: overview. *Methods Enzymol.*, 186: 1 – 85.
- Hodge, J. E. (1953). Dehydrated foods: chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 1: 928 – 43.

- Kammhuber, K., Zeidler, C., Seigner, E. & Engelhard, B. (1998). Research status on the hop component xanthohumol. Lecture held at the General Meeting of the German Society for Hop Research (DGfH), Aschheim.
- Karabin, M., Jelinek, L., Kincl, T., Hudiova, T., Kotlikova, B. & Dostalek, P. (2013). New approach to the production of xanthohumol – enriched beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 119: 98 – 102.
- Knorr, F. (1978). *Z. Lebensm. Unters. For.* 166: 228 – 233.
- Kovacevic, M. & Kac, M. (2002). Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. *Food Chemistry*, 77: 489 – 494.
- Krottenthaler, M., Back, W. & Zarnkow, M. (2009). Wort Production. In *Handbook of Brewing: processes, technology, markets*. Ed. H. M. Eslinger, 165 – 206. Weinheim: Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Krottenthaler, M. & Glas, K. (2009). "Brew Water", in Eßlinger H. M.. *Handbook of brewing*. Wiley – VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germania.
- Kunze, W. (2004). *Technology brewing and malting*. VLB, Berlin, Germania.
- Lobo, B., Patil, A., Phatak, A. & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: impact of human health. *Pharmacogn. Rev.*, 4(8): 118 – 126.
- Lowe, D.P. & Arendt, E.K. (2004). The use and effects of lactic acid bacteria on malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. *J. Inst. Brew.*, 110: 163 – 180.
- Marimuthu, S., Adluri, R. & Venugopal, P. (2007). Ferulic acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. *Clin. Biochem. Nutr.*, 40 (2): 92 -100.

- Magalhaes, P.J., Carvalho, D.O., Cruz, J.M., Guido, L.F. & Barros, A.A. (2009). Fundamentals and health benefits of xanthohumol, a natural product derived from hop and beer. *Natural Product Communications*, 4: 591 – 610.
- Magalhaes, P.J., Almeida, S.M., Carvalho, A.M. *et al.* (2011). Influence of malt on the xanthohumol and isoxanthohumol behavior in pale and dark beers: a micro – scale approach. *Food Research International*, 44: 351 – 359.
- Magalhaes, L. M., Barreiros, L., Reis, S. & Segundo, M.A. (2014). Kinetic matching approach applied to ABTS assay for high – through put determination of total antioxidant capacity of food products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33: 187 – 191.
- Maillard, M.N. & Berset, C. (1995). Evolution of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1789 – 1793.
- McFarland, B. (2010). *Le migliori birre del mondo. 1000 imperdibili marchi da Tokyo a Canberra*, de Agostini, Novara, p. 10.
- Milic, M.N., Obradovic, M.V., Grahovac Z.B. & Pavlovic A.N. (2010). Antioxidant capacities and phenolic levels of different varieties of serbian white wines. *Molecules*, 15: 2016 – 2027.
- Milligan, S.R., Kalita, J.C., Pocock, V., Van De Kauter, V., Stevens J.F., Deinzer, M.L., Rong, H. & de Keukeleire, D. (2000). The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85: 4912 – 4915.
- Miranda, C.L., Stevens, J.F., Ivanov, V., McCall, M., Frei, B., Deinzer M.L. & Buhler, D.R. (2000). Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenyated chalcones and flavanones in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3876 – 3884.
- Mitscher, L.A., Young, M., Shankel, D., Dou, J.H., Steele, L. & Pillai, S.P. (1997). Chemoprotection: A review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Camelia sinensis*) and certain its constituents. *Med. Res. Rev.*, 17: 327 – 365.

- Mizobuchi, S. & Sato, Y. (1984). A new flavanone with antifungal activity isolated from hops. *Agric. Biol. Chem.*, 48: 2771 – 2775.
- Moir, M. (2000). Hops – A millennium review. *J. Am. Soc. Brew.Chem.*, 58 (4): 131 – 146.
- Nelson, M. (2005). *The Barbarian's Beverage, a history of beer in ancient Europe*, Routledge, Oxon, pp. 9 – 11.
- Ohno, Y., Fukuda, K., Takemura, G., Toyota, M., Watanabe, M., Yasuda, N., Xinbin, Q., Maruyama, M., Akao, S., Gotou, K., Fujiwara, T. & Fujiwara, H. (1999). Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cell. *Anticancer Drugs*, 10 (9): 845 – 851.
- Pepe, C. (2010). Caratterizzazione della componente polipeptidica della birra e identificazione di epitopi potenzialmente immunogenici per i pazienti celiaci. Dottorato di ricerca in scienze e tecnologie delle produzioni agro-alimentari. Università degli studi di Napoli Federico II.
- Pirova, M. (1973). *Industrie agrarie alimentari. Vol. I. Del Bianco*, Udine.
- Pomeranz, Y. (1987). *Modern cereal. Science and Technology*. Vhc Publisher, New York.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice – Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 1231 – 1237.
- Regolamento (CE) 41/2009. Art. 3, Par. I, II, VI.
- Regolamento (UE) 1169/2011. Art. 21, Comma 1 – b.
- Sicheri, G. (1983). *Industrie agrarie*. Hoepli, Milano.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P. & Goldber, D.M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.*, 30 (2): 91 – 113.

- Stevens, J.F., Miranda, C.L. & Buhler, D.R. (1998). Chemistry and biology of hop flavonoids. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 56 (4): 136 – 145.
- Stevens, J.F., Taylor, A.W. & Deinzer, M.L. (1999). Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *J. Chromatography*, 832 (1/2): 97 – 107.
- Stevens, J.F. & Page, J.E. (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry*, 65: 1317 – 1330.
- Stocker, R. (1999). Dietary and pharmacological antioxidants in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol*, 10: 589 – 597.
- Stratil, P., Kuban, V. & Fojtova J. (2008). Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech J. Food. Sci*, 26: 242 – 253.
- Sunier, J. (1988). *La fabbricazione del malto e della birra*. Unione italiana fabbricanti birra e malto, Roma.
- Tenge, C. (2009). *Yeast*. In: H.M. Eßlinger (ed.). *Handbook of Brewing: Processes, technology, markets*. Wiley – Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN: 978 – 3 – 527 – 31674 – 8.
- Tobe, H., Muraki, Y., Kitamura, K., Komiyama, O., Sato, Y., Sugioka, T., Maruyama, H.B., Matsuda, E. & Nagai, M. (1997). Bone resorption inhibitors from hop extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61: 158 – 159.
- Torssell, K.B.G. (1997). A Mechanistic, biosynthetic and ecological approach. Apotekarsocieteten – Swedish Pharmaceutical Society, Stockholm, Sweden. UK, ISBN. *Natural Product Chemistry*, 91 – 8627 – 4635.
- Tubaro, F. (2009). Antioxidant activity of beer's Maillard reaction. Products: feature and health aspects. *Beer in Health and Disease Prevention*, ISBN: 978 – 0 – 12 – 373891 – 2.
- Turri, N. (2008). *Tecnologia della birra fatta in casa*, Editore Mulino Don Chisciotte, p. 8, 13.

- Van Landschoot, A. (2011). Gluten – free barley malt beers. *Cerevisia*, 36: 93 – 97.
- Varnam, A.H. & Sutherland, J.P. (1994). *Alcoholic beverages: 1. Beer. Beverages. Technology, chemistry and microbiology*, vol. II, Chapman & Hall.
- Villano, D., Fernandez – Pachon, M.S., Troncoso, A.M. & Garcia – Parilla, M.C. (2004). The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time. *Talanta*, 64 (2): 501 – 509.
- Vinson, J.A., Mandarano, M., Hirst, M., Trevithick, J.R. & Bose, P. (2003). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *J. Agric. Food. Chem.*, 51: 5528 – 5533.
- Vitagliano, M. (2002). *Tecnologie e trasformazione dei prodotti agrari*. Calderini edagricole, Bologna.
- Wang, Q., Ding, Z.H., Liu, J.K. & Zheng, Y.T. (2004). Xanthohumol, a novel anti – HIV – 1 agent purified from hops (*Humulus lupulus*). *Antiviral Res.*, 64: 189 – 194.
- Wijewickreme, A.N. & Kitts, D. (1998). Metal chelating and antioxidant activity of model Maillard reaction products. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 434: 245 – 254.
- Wiseman, H. & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progressive to cancer. *Biochem. J.*, 313: 17 – 29.
- Woffenden, H.M., Ames, J.M., Chandra, S., Anese, M. & Nicoli, C. (2002). Effect of kilning on the antioxidant and pro – oxidant activities of Pale Malts. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4925 – 4933.
- Wolf – Hall, C.E. (2007). Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *Inter. Journal of Food Microbiology*, 119: 89 – 94.

- Wunderlich, S., Zurcher, A. & Back, W. (2005). Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49: 874 – 881.
- Yamamoto, K., Wang, J., Yamamoto, S. & Tobe, H. (2000). Suppression of cyclooxygenase – 2 gene transcription by humulone of beer hop extract studied with reference to glucocorticoid. *FEBS Lett.*, 465: 103 – 106.
- Young – In, K. (2007). Food ingredient design strategies for chemoprevention of disease using phenolic phytochemicals.
- Zambonelli, C., Tini, C., Giudici P. & Grazia, L. (1999). *Microbiologia degli alimenti fermentati*. Calderini edagricole, Bologna.
- Zang, L.Y., Cosma, G., Gardner, H., Shi, X., Castranova, V. & Vallyathan, V. (2000). Effect of antioxidant protection by p – coumaric acid on low – density lipoprotein cholesterol oxidation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*, 279 (4): 954 – 960.
- Zasio G., Cardone, C. & Maturano, G. (1997). *Sapere di birra. Storia, produzione, qualità, legislazione e spillatura*. Ed. Birra Peroni, Roma.
- Zhao, H., Chen, W., Lu, J. & Zhao, M. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, 119 (3): 1150 – 1158.
- Zhu, L., Zhang, Y., Deng, J., Li, H. & Lu, J. (2012). Phenolic concentration and antioxidant properties of wines made from North American grapes grown in China. *Molecules*, 17: 3304 – 3323.

8. SITOGRAFIA

- www.arclastaffetta.it
- www.artigianbeer.com
- www.aitbm.it
- www.bebeer.it
- www.birramia.it
- www.brewtheplanet.it
- www.camra.org.uk
- www.cronachedibirra.it
- www.enelgreenpower.com
- www.fermentobirra.com
- www.vaporidibirra.it

RINGRAZIAMENTI

Giunto al termine di questo lavoro di tesi ritengo opportuno ringraziare tutti coloro i quali hanno contribuito alla realizzazione dello stesso.

Innanzitutto un ringraziamento speciale lo devo al Dott. Matteo Iannone, presidente dell'Associazione ARCI "La Staffetta", senza il quale questo progetto di tesi non sarebbe mai nato; lo ringrazio per la fiducia riposta nella mia persona e per il supporto, pratico e morale, fornitomi in quest'ultimo anno.

Un ringraziamento va anche al birrificio "Vapori di Birra" ed in particolar modo ad Edo Volpi e sua figlia Chiara, per aver messo a disposizione il proprio impianto per la produzione delle ricette artigianali oggetto di tale lavoro.

Desidero poi ringraziare sinceramente la Prof.ssa Annamaria Ranieri ed il Dott. Andrea Serra per la disponibilità data a seguire tale lavoro da un punto di vista accademico, per la professionalità e la gentilezza sempre mostrate nei miei confronti.

Infine, un ringraziamento particolare lo devo alla Dott.ssa Antonella Castagna la quale mi ha seguito e supportato con pazienza durante le attività di laboratorio.